

Aus dem Institut für Pathobiochemie/Laboratoriumsmedizin  
der Medizinischen Fakultät Charité, Campus Virchow-Klinikum  
der Humboldt-Universität zu Berlin  
DISSERTATION

Bakterielles Superantigen verstärkt die  
Atemwegsinflammation und bronchiale  
Atemwegsreagibilität in einem Mausmodell der  
allergischen Sensibilisierung.

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

Vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité  
der Humboldt Universität zu Berlin

von René Rückert aus Neubrandenburg

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h. c. R. Felix

Gutachter: 1. Prof. Dr. Renz, Marburg  
2. Prof. Dr. Kunkel, Berlin  
3. Prof. Dr. Heeg, Marburg

Eingereicht: 30. November 1999

Datum der Promotion: 26. Juni 2000 (summa cum laude)

<b>Abstract Deutsch</b>	<b>5</b>
<b>Schlagworte Deutsch</b>	<b>5</b>
<b>Abstract english</b>	<b>6</b>
<b>Keywords english</b>	<b>6</b>
<b>Einleitung</b>	<b>7</b>
<b>Asthma Bronchiale</b>	<b>7</b>
<b>Morphologische Veränderungen bei AB</b>	<b>8</b>
<b>Tiermodelle für die allergische Sensibilisierung</b>	<b>9</b>
<b>Bakterielle Superantigene</b>	<b>9</b>
<b>Immunologische Aspekte des extrinsischen AB</b>	<b>11</b>
<b>Allergenpräsentation und allergische Sensibilisierung</b>	<b>11</b>
<b>T-Helfer Zellen als Induktoren allergischer Sensibilisierung.</b>	<b>12</b>
<b>Interleukin-5</b>	<b>13</b>
<b>Eosinophile Granulozyten</b>	<b>13</b>
<b>Funktion des CD23 Rezeptors bei allergischen Erkrankungen</b>	<b>14</b>
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	<b>15</b>
<b>Ziel der Arbeit</b>	<b>16</b>
<b>Tiere und Behandlungsprotokolle</b>	<b>17</b>
<b>Immunisierung</b>	<b>17</b>
<b>Lokale Allergenchallenge mittels Aerosol</b>	<b>17</b>
<b>Narkose und Nasalapplikation</b>	<b>17</b>
<b>Narkose</b>	<b>17</b>
<b>Nasale Applikation von Flüssigkeiten</b>	<b>18</b>
<b>Behandlungsschema der Mäuse</b>	<b>18</b>
<b>Allergische Sensibilisierung gegen Ovalbumin (OVA)</b>	<b>19</b>
<b>Additive Behandlung der OVA sensibilisierten Tiere mit nasal appliziertem SEB</b>	<b>19</b>
<b>Präparation der Tiere</b>	<b>20</b>
<b>Histologie der Lunge</b>	<b>20</b>
<b>Durchführung der bronchoalveolaren Lavage</b>	<b>20</b>
<b>Zytozentrifugation der durch die BAL gewonnenen Zellen</b>	<b>21</b>
<b>Quantitative Antikörperbestimmung mittels Enzyme-Linked Immuno Sorbant Assay (ELISA)</b>	<b>21</b>
<b>Durchführung des ELISA zur Bestimmung des Gesamt-IgE</b>	<b>22</b>
<b>ELISA zur Bestimmung von OVA-spezifischem IgE, IgG1 und IgG2a</b>	<b>22</b>
<b>Protokolle der IL-4, IL-5 und IFN-<math>\gamma</math> Zytokin - ELISA</b>	<b>23</b>
<b>Messung der bronchialen Hyperreagibilität</b>	<b>24</b>

Statistische Auswertung der Ergebnisse	25
<b>ERGEBNISSE</b>	26
Aspiration nasal applizierter Reagenzien in die Lungenperipherie	26
SEB Titration: Modell des intrinsischen AB	27
Dosisabhängiger Anstieg der Gesamtzellzahl in der BAL	27
Zelldifferenzierung der BAL Zellen	28
Dosisabhängige peribronchiale Inflammation	29
Zytokinkonzentration in der BAL	31
Dosisabhängiger Anstieg der TNF- $\alpha$ Konzentration in der BAL nach SEB Applikation	32
Nasal appliziertes SEB induziert bronchiale Hyperreagibilität	32
Einfluß von SEB auf OVA sensibilisierte C57BL/6 Mäuse.	33
Anstieg der Immunglobulintiter nach OVA - Sensibilisierung	34
Histologischer Nachweis der Inflammation in der Lunge von C57BL/6	34
Zunahme der Absolutzellzahl in der BAL	36
Anstieg der Eosinophilen und Lymphozyten in der BAL	36
Zytokinkonzentration in der BAL von C57BL/6 Wt Mäusen	37
Bronchiale Hyperreagibilität nach OVA Sensibilisierung und SEB Applikation	38
Einfluß des CD23 Rezeptors	39
Einfluß des CD23 Rezeptors auf die allergische Sensibilisierung	39
CD23 $-/-$ ist ein entscheidender Faktor für pulmonale Inflammation	40
Anstieg der Zellzahl in der BAL von CD23 $-/-$ Mäusen	41
Signifikante Unterschiede der BAL - Zelldifferenzierung in C57BL/6 Wt versus CD23 $-/-$	42
Zytokinkonzentration in der BAL von CD23 $-/-$ Mäusen	43
CD23 $-/-$ entwickeln keine BHR	44
Rolle von TNF- $\alpha$ in der Induktion von BHR	45
Zusammenfassung der Ergebnisse	47
<b>DISKUSSION</b>	49
SEB induziert lokale Inflammation und BHR: Modell für intrinsisches AB	49
C57BL/6 Mäuse entwickeln BHR nach SEB Applikation	50
Lokale SEB Behandlung verstärkt allergische Inflammation und BHR in OVA - Sensibilisierten C57BL/6 Wt Mäusen	52
Einfluß des CD23 Rezeptors auf die SEB Wirkung	54
TNF- $\alpha$	56
Zusammenfassung	57
Abkürzungen	65
<b>LEBENS LAUF</b>	66

<b>PUBLIKATIONSLISTE</b>	<b>67</b>
<b>Paper:</b>	<b>67</b>
<b>Abstracts:</b>	<b>69</b>
<b>Danksagung</b>	<b>72</b>
<b>Eidesstattliche Erklärung</b>	<b>73</b>

## **Abstract Deutsch**

Asthma Bronchiale (AB) ist eine chronisch- obstruktive, teilweise reversible Entzündung der Atemwege, deren klinisches Korrelat die bronchiale Hyperreagibilität (BHR) ist. Es lassen sich aufgrund ethiologischer Faktoren extrinsisches und intrinsisches AB unterscheiden, wobei ersteres auf einer allergischen Sensibilisierung und letzteres auf irritativen oder infekti bedingten entzündlichen Prozessen beruht. In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluß von bakteriellem Superantigen auf die Entzündungsreaktion und die bronchiale Hyperreagibilität untersucht. Staphylococcal enterotoxin B (SEB) wurde hierbei als Modellsubstanz in einem Mausmodell eingesetzt, da SEB produzierende Staphylokokken im Nasenrachenraum von Asthmatikern nachgewiesen werden konnten. Nasale Applikation von SEB induzierte in C57BL/6 Mäusen eine Entzündungsreaktion mit Influx von Lymphozyten und eosinophilen Granulozyten sowie gesteigerte Produktion von IL-4, IL-5 und TNF-alpha in der Lunge, welches in der Histologie und Bronchiallavage nachgewiesen wurde. Desweiteren führt SEB allergenunabhängig zur Ausbildung von BHR. SEB Applikation in einem Mausmodell der allergischen Sensibilisierung (gegen Ovalbumin in C57BL/6 Mäusen) verstärkt die allergische Entzündung in der Lunge und die BHR. CD23 (Low-Affinity IgE Rezeptor) Knock out Tiere zeigen nach allergischer Sensibilisierung und SEB Behandlung keinen Anstieg der TNF-alpha Produktion und keine Hyperreagibilität. Aus diesen Ergebnisse läßt sich schlußfolgern: I. Bakteriell es Superantigen induziert das Vollbild des intrinsischen AB im Tiermodell. II. Bakteriell es Superantigen kann das extrinsische, allergische AB verstärken. III. Der CD23 Rezeptor ist essentiell für die TNF-alpha Produktion und die Induktion von BHR. Diese Resultate sollten in klinischen Studien am Patienten überprüft werden, da aufgrund der hier vorliegenden Daten zu erwarten ist, daß Antibiotikatherapie, und damit Elimination superantigenproduzierender Bakterien im Nasenrachenraum, die klinische Symptomatik des AB reduzieren kann.

Schlagworte Deutsch: Asthma, Superantigen, CD23, Hyperreagibilität, OVA

## **Abstract english**

Asthma bronchiale (AB) is an obstructive, partially reversible chronic inflammatory disease of the small airways, which clinical correlate is represented by airway hyperreactivity. Based on etiological factors, AB can be divided in extrinsic and intrinsic AB, where the first depends on an allergic sensitization and the latter on airway irritation by environmental factors or airway inflammation due to viral or bacterial infection. In this thesis, the role of bacterial superantigens in airway inflammation and –hyperreactivity is analyzed. Staphylococcal enterotoxin B (SEB) was used as a prototypic substance, since SEB producing Staphylococcal aureus can be found in the nose and pharynx of asthmatic patients.

Nasal application of SEB in C57BL/6 mice resulted in airway inflammation characterized by an influx of lymphocytes and eosinophil granulocytes and increased production of IL-4, IL-5, and TNF-alpha, which was analyzed by histology and bronchiolalveolar lavage. Furthermore, SEB induced independent of allergens airway hyperreactivity.

SEB application in a mouse-model of allergic sensitization (to ovalbumin in C57BL/6 mice) boosts the allergen-induced allergic inflammation and airway hyperreactivity.

CD23 (low-affinity IgE receptor) knock out mice showed no increased TNF-alpha production and no airway hyperreactivity after allergic sensitization and SEB treatment.

These results demonstrate: I. Bacterial superantigen can induce intrinsic AB in a mouse model. II. Bacterial superantigen can significantly boost the allergic, extrinsic AB. III. The CD23 receptor is essential for TNF-alpha production and for the induction of airway hyperreactivity.

Based on these findings, clinical surveys should be performed, since one could expect, that eradication of nasal bacterial carriage and therefore local superantigen sequestration should improve the AB- symptoms in affected patients.

Keywords English: Asthma, Superantigen, CD23, Hyperreactivity, OVA

# Einleitung

## Asthma Bronchiale

Asthma Bronchiale (AB) ist eine chronisch obstruktive, teilweise reversible Erkrankung der Atemwege, die durch inflammatorische Prozesse der Atemwege hervorgerufen wird.

AB beruht auf entzündlichen oder irritativ bedingten morphologischen Veränderungen des Bronchialsystems, die auf allergische - immunologischen Veränderungen beruhen. Das Allergische Asthma ist eine Erkrankung mit multifaktorieller Genese, wobei bis heute nicht geklärt ist welche Faktoren primäre Induktoren oder sekundäre Modulatoren sind. Die genetische Disposition spielt eine Rolle, atopische Erkrankungen der Eltern korrelieren mit dem Auftreten von Allergien und der IgE Serumkonzentration bei Kindern ([De Sanctis et al, 1995](#); [Van Harwerden et al, 1995](#); [Postma et al, 1995](#)). Umweltfaktoren wie hohe Ozonbelastung und Luftverschmutzung steigern die Inzidenz für AB und Bronchitis ([Von Mutius et al, 1994](#)) ebenso wie induzierte oder genetisch bedingte neuronale Dysregulation des Immunsystems was z. B. für die Dichte oder Regulation adrenerger Rezeptoren nachgewiesen wurde ([Turki et al, 1995](#)).

Die Symptome des extrinsischen AB basieren auf einer allergischen Sensibilisierung mit Induktion allergenspezifischer Antikörper und T - Lymphozyten nach der ersten Allergenexposition. Wiederholter Allergenkontakt führt zu lokalen inflammatorischen Reaktionen des Soforttyps in der Lunge, wobei Eosinophile Granulozyten ein Hauptdiagnosekriterium der allergischen Inflammation repräsentieren. Kennzeichen dieser Erkrankungen sind eine überschießende Produktion von IgE gegen normalerweise „harmlose“ Antigene, eine profunde Entzündungsreaktion in der Lunge bzw. der Haut und, im Falle des Asthma bronchiale, die Entwicklung von bronchialer Hyperreagibilität gegenüber spezifischen (Allergen) und unspezifischen (Kälte) Stimuli. Die zentrale Rolle der T-Zellen in der Immunpathogenese dieser allergischer Erkrankungen ist hinreichend etabliert. Insbesondere das Konzept der dysregulierten T-Helfer 2 (TH-2) Funktion als kausale Ursache der Allergien hat wesentlich zum Verständnis der Immunpathogenese der allergischen Erkrankungen beigetragen. Jedoch genügt aus heutiger Sicht dieser konzeptionelle Ansatz als kausale Krankheitserklärung der Allergie nicht mehr aus und muß, insbesondere bei den chronischen allergischen Erkrankungen, revidiert werden.

Neben dem IgE-abhängigen Asthmatyp existiert auch ein IgE-unabhängiger Asthmatyp. Diese IgE-unabhängige Asthmaform wird auch als "intrinsisches Asthma" bezeichnet. Häufig kommen beide Reaktionsformen nebeneinander im selben Patienten vor, so ist z.B. bei Patienten mit IgE-abhängigem allergischem Asthma die Exazerbation bei bestimmten viralen und bakteriellen Infektionen hinreichend bekannt. Obwohl das intrinsische Asthma noch wenig beforscht ist, ist es bemerkenswert, daß beide Reaktionsformen ähnliche immunpathogenetische Zusammenhänge aufweisen ([Meissner et al, 1997](#), [Werfel et al, 1997](#)). Einstrom und Aktivierung von präferenziellen TH-2 CD 4 T-Zellen assoziiert mit lokaler Eosinophilie spielt offensichtlich auch beim IgE-unabhängigem Asthma bronchiale eine entscheidende Rolle. Ein möglicherweise wichtiger Unterschied besteht in der quantitativen und qualitativen Ausprägung der Makrophagenaktivierung. Diese ist beim intrinsischen Asthma besonders

ausgeprägt, wie in einer Reihe *ex-vivo/in-vitro* Studie gezeigt werden konnte.

Die klinische Diagnose wird vor allem aufgrund der Veränderung diverser pneumonologischer Parameter gestellt, die Ausdruck einer bronchialen Hyperreagibilität (BHR) sind ([Roisman et al, 1995](#)).

Hauptsymptome sind ein erhöhter Atemwiderstand der die Expiration behindert sowie Steigerung der Atemfrequenz und Hypoxämie infolge regionaler Minderbelüftung der Lunge.

Der Erkrankungsbeginn bei atopischem Asthma liegt üblicherweise weit vor dem 20. Lebensjahr. Die kontinuierlich ansteigende Inzidenz von momentan 6% in den hochentwickelten Industrienationen zeigt die enorme klinische Bedeutung und begründet die Notwendigkeit intensiver Forschung auf diesem Gebiet da eine gezielte Behandlung nur auf der Grundlage vollständig bekannter Pathomechanismen erfolgen kann ([Aberg et al, 1996](#)).

### Morphologische Veränderungen bei AB

AB ist mit morphologischen Veränderungen in der Lunge assoziiert. Aufgrund der chronisch - inflammatorischen Prozesse findet sich peribronchial ein Zellinfiltrat, daß vor allem aus Eosinophilen und Mastzellen ([Djukanovic et al, 1990](#)) sowie Lymphozyten ([Jeffrey et al, 1989](#); [Bradley et al, 1991](#)) besteht.

Bei der Entzündungsreaktion nach wiederholtem Allergenkontakt aus Mastzellen freigesetzte Mediatoren wie Histamin, Bradykinin und Leukotriene erhöhen die Permeabilität der postkapillaren Venolen. Es kommt zum Austritt von Plasma in das umliegende Gewebe mit Ausbildung eines Mucosaödems, welches in Verbindung mit einer gesteigerten Schleimsekretion der Gobletzellen zur Obstruktion der Atemwege führt. Die BHR beim AB basiert auch auf einer Veränderung der Innervation der glatten Muskulatur. Weiterhin konnte gezeigt werden, daß Neuropeptide wie Nerve Growth Factor die Entzündung und die lokale IL-4 und IL-5 Produktion in der Lunge steigern ([Braun et al, 1998](#)).

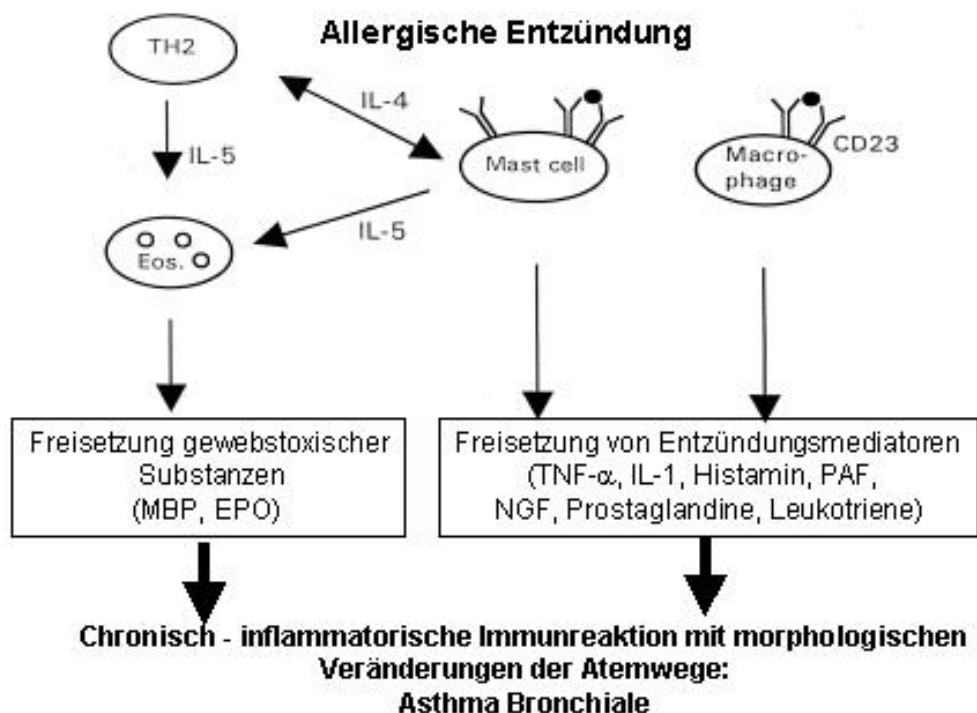


Abb. 1:



Übersicht über die wichtigsten Effektoren (zellulär und lösliche Faktoren) bei allergischen Reaktionen und morphologischen Umbauvorgängen. (Details im Text).

Die klinische Problematik der Inflammation und der durch sie verursachten morphologischen Veränderungen zeigt sich in der direkten Korrelation der Entzündung mit der BHR bei Asthmapatienten ([Bousquet et al, 1990](#)). Die Untersuchung der pathophysiologischen Mechanismen und die Kontrolle der entzündlichen Veränderungen in der Lunge sind damit Hauptschwerpunkte der Forschung mit dem Ziel einer effektiveren Therapie von AB, hinausgehend über die heutige, vor allem symptomatischen Behandlungsansätze.

### **Tiermodelle für die allergische Sensibilisierung**

Um *in vivo* die verschiedenen morphologischen und pathophysiologische Veränderungen bei allergischen Erkrankungen zu untersuchen, wurden diverse Tiermodelle etabliert, hauptsächlich in verschiedenen Mausstämmen ([Herz et al, 1996 a](#)), Ratten und Meerschweinchen. Das Immunsystem dieser Tiere ist gut charakterisiert, eine Vielzahl von Antikörpern und Nachweisverfahren sind verfügbar und aufgrund klar definierter Tierstämme kann der Einfluß genetische Faktoren untersucht werden kann ([De Sanctis et al, 1995](#)). Ein verbreitetes Modell ist die Sensibilisierung von C57BL/6 Mäusen mit intraperitoneal injiziertem Ovalbumin (OVA) und anschließender lokaler pulmonaler Provokation mit aerosolisiertem OVA. Nach wiederholter Allergenexposition kann die Sensibilisierung durch Bestimmung der IgE/IgG Serumtiter quantifiziert werden. Der auch klinisch relevante Nachweis einer Soforttypreaktion kann in der Haut durch Injektion von Allergenen erfolgen (Intrakutantests). Eine Soforttypreaktion in der Lunge, wie sie klinisch bei einem Großteil der Asthmatiker das Leitsymptom darstellt, kann durch Messung der BHR nachgewiesen werden ([Renz et al, 1992](#); [Oshiba et al, 1996](#)). Für die Ausbildung der asthmatischen BHR werden unter anderem verschiedene peribronchiale inflammatorische Prozesse verantwortlich gemacht, die in unterschiedlicher Ausprägung auch im Tiermodell beobachtet werden können. Aufgrund unterschiedlicher genetischer Disposition induziert die lokale Allergenchallenge in C57BL/6 ("low responder") im Gegensatz zu Balb/c Mäuse ("high responder") nur eine geringgradige Inflammation in der Lunge. Darum eignet sich dieser Mausstamm ausgezeichnet als Modell für die Untersuchung zusätzlicher Triggerfaktoren der allergische Inflammation und wurde für die vorliegende Arbeit zur Untersuchung der Rolle von bakteriellem Superantigen ausgewählt.

### **Bakterielle Superantigene**

Die T-Zell- und Eosinophilen dominierte Entzündungsreaktion ist typisch für unterschiedliche Ätiologien des AB, und unterschiedliche Stimuli können über eine lokale T-Zell Aktivierung von antigenpräsentierenden Zellen diesen Entzündungstyp verursachen. Eines der am besten untersuchten

Modelle für das infektbedingte, intrinsisches AB stellt die experimentelle RSV-Infektion dar, bei der die Entwicklung von bronchialer Hyperreagibilität in Assoziation von T-Zell abhängigen Entzündungsreaktionen dokumentiert werden konnte. Hingegen gibt es für bakteriell bedingte Exazerbationsformen bis heute kein etabliertes Modell.

Patienten mit Erkrankungen des atopischen Formenkreises (atopische Dermatitis, Asthma bronchiale, allergische Rhinitis/Konjunktivitis) zeigen eine erhöhte Prävalenz von lokalen Staphylokokken-Besiedlungen. Wichtiges Reservoir für *S. aureus* stellt hierbei die chronische Besiedlung der Nase dar. Wichtige Pathogenitätsfaktoren von *S. aureus* sind Staphylokokken Enterotoxin (SE)-A, SEB, SEC, SED, SEE und Toxikshocksyndrom-Toxin 1 (TSST-1) zählen, welche als SA bezeichnet werden.

SA sind von Bakterien produzierte (oder von Viren kodierte) Proteine, die im Gegensatz zu konventionellen Antigenen ohne Prozessierung durch APCs an MHC Klasse II Moleküle und an die variable  $\beta$ -Kette ( $V\beta$ ) des T-Zell Rezeptors (TCR) binden können. Die verschiedenen SA unterscheiden sich in der spezifischen Präferenz der  $V\beta$  TCR. Das für dieser Arbeit eingesetzte Staphylococcal enterotoxin B (SEB) bindet an- und aktiviert T-Zellen mit  $V\beta 7$  und  $V\beta 8$  TCR, die ca. 20% der gesamten peripheren T-Zellen repräsentieren. Demgegenüber beträgt die Frequenz antigenspezifischen Zellen gerichtet gegen konventionelle Antigene  $1 \times 10^{-4}$  bis  $1 \times 10^{-5}$ .

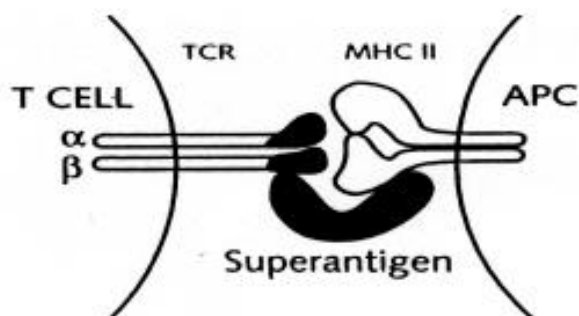


Abb. 2:

Schematische Darstellung der Bindung von SA an den variablen Teil der  $\beta$ -Kette des T-Zell Rezeptors und an MHC II der APC.

Da *Staphylococcus aureus* ein ubiquitär vorkommendes Bakterium ist und verschiedene Gruppen SA produziert, können die diversen SA insbesondere bei pathologischen Prozessen in Bereichen mit bakterieller Besiedlung (Haut, Intestinum, Nasopharyngealraum) eine Rolle spielen. Die lokale Applikation von SEB führt zu verstärkter  $V\beta 8$  selektiver Adhäsion von T Zellen an MHCII positive Endothelzellen ([Kita et al, 1996](#)). Nach erfolgter Bindung und Aktivierung produzieren die Zellen IL-2 und TNF- $\alpha$  ([Litton et al, 1994](#)), die bei Aktivierung aller  $V\beta 7^+$  und  $V\beta 8^+$  Zellen zum toxischen Schock führen können ([Miethke et al, 1992](#)), der weitere Verlauf der Reaktion im Tiermodell zeigt abhängig vom Behandlungsprotokoll Anergie oder totale Deletion der reaktiven T Lymphozyten.

SA spielen als sehr potente T - Zell - Aktivatoren eine bedeutende Rolle in der Pathogenese des Septischen Schock Syndroms ([Miethke et al, 1992](#)), Rheumatoider Arthritis ([Paliard et al, 1991](#)), Psoriasis ([Leung et al, 1993](#)), Kawasaki Syndrom ([Leung et al, 1992](#)) und Atopischer Dermatitis ([Lester et al, 1995](#); [Herz et al, 1998](#)). In Atopischer Dermatitis (AD) wirkt *S. aureus*, der aus Hautläsionen isoliert werden kann ([Leyden et al, 1974](#)), als zusätzlicher Triggerfaktor der Inflammation. Weiterhin konnten im Serum von AD Patienten IgE Antikörper gegen Staphylokokken Enterotoxine nachgewiesen werden ([Leung et al, 1993](#)).

In PBMC von Patienten mit Atopischer Dermatitis konnte ein klinisch relevanter proinflammatorische Einfluß von SEB mit Steigerung der IL-4 und IL-5 Produktion gezeigt werden ([Neuber et al, 1995](#); [König et al, 1995](#)). Aufbauend auf die bekannten Daten soll mit dieser Arbeit die Rolle bakteriellen Superantigens als proinflammatorischer Mediator allergenunabhängiger BHR (intrinsisches AB) sowie als Triggerfaktor der allergischen, IgE/IgG1 vermittelten Inflammation in einem Tiermodell des extrinsischen AB untersucht werden.

## **Immunologische Aspekte des extrinsischen AB**

### **Allergenpräsentation und allergische Sensibilisierung**

Eine Sensibilisierung erfolgt nach dem ersten Kontakt und der Präsentation des Allergens durch Antigenpräsentierenden Zellen (APC), bei der im Tiermodell bevorzugten intraperitonealen Sensibilisierung v.a. Peritonealmakrophagen. Das Allergen wird phagozytiert, in kurze Peptidfragmente gespalten, anschließend intrazellulär an MHC Klasse II Moleküle gebunden, die dann mit dem Peptid an der Zelloberfläche präsentiert werden. Dieser Allergen - MHC Klasse II Komplex wird von CD4 positiven T-Zellen erkannt, die spezifische Immunreaktion gegen exogene Antigene induzieren.

Diese Interaktion führt - verstärkt durch weitere kostimulatorische Rezeptorinteraktionen und "lösliche" Mediatoren wie das von APC sezerniertem IL-1 - zur monoklonalen Proliferation dieser T-Zellen. Unterhalten wird die Proliferation z.B. durch IL-2, welches von den aktivierten CD4 Zellen gebildet wird.

Nach Präsentation der Peptide kommt es zur physikalischen Interaktion der CD4 Lymphozyten mit Antikörper produzierenden B-Zellen. Als kostimulatorische Signale für den Th2 induzierten „class switch“ in B-Zellen mit IgE und IgG1 Produktion durch B-Zellen wirken die von den T-Zellen produzierten Zytokine IL-4 und IL-13 ([Kühn et al, 1991](#); [Punnonen et al, 1993](#); [Kopf et al, 1993](#)). Die essentielle Rolle von IL-4 konnte durch Experimente mit blockierenden Antikörpern demonstriert werden, Inhibition von IL-4 *in vitro* unterdrückt die IgE und IgG1 Produktion ([Renz et al, 1995](#)). Blockade von IL-13 mit einem löslichen IL-13R $\alpha$  Fusionsprotein blockiert die allergische Entzündung in der Lunge im Mausmodell, und beweist damit, daß auch dieses Zytokin eine entscheidende Rolle bei der lokalen Entzündung bei AB spielt ([Wills-Karp et al, 1998](#), [Grünig et al, 1998](#))

### T-Helfer Zellen als Induktoren allergischer Sensibilisierung.

Innerhalb der T-Zell Population wurde anhand des sezernierten Zytokinmusters in der Maus eine Unterteilung in T-Helfer Zellen 1 (Th1) und T-Helfer Zellen 2 (Th2) eingeführt ([Mosmann et al, 1986](#)). Die Entwicklung von naiven T-Zellen (Th0) in eine der Subklassen ist zytokinabhängig ([Daser et al, 1995](#)): IFN- $\gamma$  und IL-12 stimulieren die Entwicklung von Th0 Zellen in Richtung Th1 und antagonisieren die Th2 Entwicklung. IL-4 und IL-13 determinieren die Entwicklung von Th0 in Th2 Zellen und hemmen eine Th1 - Induktion.

Diese gegenseinnige Regulation ist bei atopischen Patienten gestört, eine gesteigerte Th2 Zytokinproduktion (IL-4 und IL-13) führt in B-Zellen zu gesteigerter IgE Synthese, eine der Hauptdeterminanten für atopische Erkrankungen ([Brinkmann and Kristofic, 1995](#); [Lebman et al, 1988](#)). IgE bindet an Effektorzellen (v.a. Mastzellen) und führt nach Vernetzung durch das Antigen zur Freisetzung von Entzündungsmediatoren (Soforttypreaktion).

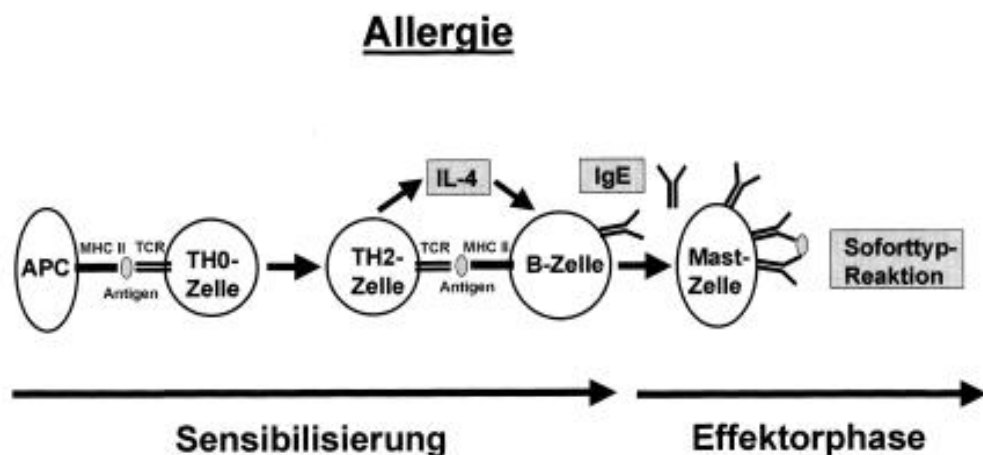


Abb. 3:

Schematische Darstellung der allergischen Sensibilisierung und der Effektorphase (Soforttypreaktion).

Die wichtigsten von Th1 Zellen sezernierten Zytokine, IL-12 und IFN- $\gamma$ , wirken einer IgE Produktion entgegen, sind aber von Bedeutung bei der zellulären zytotoxischen Immunantwort (Aktivierung von Makrophagen, allergische Spätreaktion).

Von Th1 Zellen produziert Granulocyte-Monocyte cell stimulating factor (GM-CSF) kann bei der Th2 induzierten allergischen Inflammation eosinophile Granulozyten aktivieren, ihre Apoptose inhibieren

([Hallsworth et al](#), 1992) sowie die TNF- $\alpha$  Synthese steigern.

Dieser synergistische Effekt der Th1/Th2 Zytokine zeigt die Problematik und Unzulänglichkeit der scharfen Abgrenzung von Zell - Subpopulationen und Zytokingruppen und die große Komplexität des Immunsystems.

Es konnte weiterhin gezeigt werden, daß im C57BL/6 Mausmodell an Haptene gebundenes exogenes Allergen (OVA) intravakuolär auch an MHC I gebunden werden kann. Diese induzierten nach Kontakt mit CD8 positiven Zellen („Zytotoxische Zellen“) eine spezifische T-Zell Antwort ([Harding and Song](#) 1994) was die Notwendigkeit zeigt, die klassische Theorie der Pathogenese des AB als singuläre, Th2 vermittelte Reaktion einer Revision, mindestens aber einer Erweiterung zu unterziehen.

### **Interleukin-5**

Das von Th2 Zellen produzierte IL-5 ist eines der wichtigsten Zytokine der allergischen Inflammation und spielt eine bedeutende Rolle in der Immunpathogenese des extrinsischen AB. Eine bestehende allergische Sensibilisierung wird durch IL-5 verstärkt, da es den durch IL-4 induzierten Class-switch in B Zellen triggern und verstärken kann, und somit die Produktion der Th2 Immunglobuline IgE und IgG1 verstärkt ([Purkerson and Isakson](#), 1992).

Die bedeutenderen Effekte von IL-5 betreffen aber die Exazerbation und Unterhaltung der allergischen Inflammation. Es wirkt chemotaktisch und aktivierend auf Eosinophile Granulozyten und inhibiert deren Apoptose ([Sanderson](#) 1992). Die Konzentration von IL-5 in der BAL-Fluid korreliert mit der Zahl der eosinophilen Granulozyten und der Lymphozyten in der BAL ([Sur et al](#), 1995), während ein Antikörper gegen IL-5 deren Zahl in der BAL und im peribronchialen Gewebe verringert ([Kung et al](#), 1995). Lungenmastzellen, Eosinophile und das Bronchialepithel produzieren nach Stimulation IL-5 und tragen damit zur Induktion und Unterhaltung der Inflammation bei ([Okayama et al](#), 1995; [Broide et al](#), 1992). Proinflammatorisch wirkt es weiterhin, indem die Produktion von IL-1 und TNF- $\alpha$  in Monozyten induziert wird. Transgenen Mäusen für IL-5 (mit gesteigerter Produktion des Zytokins) zeigen eine Hypereosinophilie, die aber nicht mit bronchialer Hyperreagibilität korreliert ([Lefort et al](#), 1996). Da die Hypereosinophile Inflammation alleine nicht hinreichend für die Ausbildung der BHR ist, zeigt diese Beobachtung die Notwendigkeit eines distinkten solitären oder additiven Faktors für die Ausbildung von Hyperreagibilität der glatten Atemwegsmuskulatur.

### **Eosinophile Granulozyten**

Eosinophile werden als bedeutendste zelluläre Komponente der allergischen Inflammation asthmatischer Luftwege betrachtet. Sie produzieren zytotoxische basische Proteine wie Major basic protein (MBP), Eosinophilic peroxidase (EPO), Eosinophil-derived neurotoxin (EDN) und Eosinophilic cationic protein (ECP), deren erhöhte Konzentration in der BAL asthmatischer Patienten direkt mit dem Grad der

Epithelzerstörung korreliert. Intratracheale Instillation des MBP induziert bronchiale Hyperreagibilität in Ratten ([Coyle et al, 1995](#)), die Neutralisation in einem OVA Modell der allergischen Inflammation inhibiert die BHR ([Lefort et al, 1996](#)). Eosinophile selbst produzieren proinflammatorische Zytokine wie GM-CSF ([Mogbel et al, 1991](#)), IL-5 ([Desreumaux et al, 1992](#)), IL-4 ([Möller et al, 1996](#)) sowie TNF- $\alpha$  und MIP-1 $\alpha$  ([Costa et al, 1993](#)). Die autokrin wie parakrin wirkenden Zytokine IL-5 und GM-CSF verhindern die Apoptose und wirken chemotaktisch für Eosinophile, was zu einer Akkumulation im Gewebe führt ([Woollley et al, 1996](#); [Van Oosterhout et al, 1995](#)). Wie bereits erwähnt zeigen IL-5 überexprimierende Mäuse eine Hypereosinophilie, aber keine BHR ([Lefort et al, 1996](#)).

Humane Eosinophile exprimieren den Low Affinity IgE Rezeptor (CD23) und wahrscheinlich auch den High Affinity IgE Rezeptor ([Capron et al, 1995](#)). Diese können IgE binden, dessen Vernetzung durch Allergenbindung zur Freisetzung der zytotoxischen Proteine führt. Ein weiterer Mechanismus der die Sezernation von EDN triggert ist die Vernetzung von CD4 Rezeptoren auf Eosinophilen, die nach TNF- $\alpha$  Stimulation verstärkt exprimiert werden ([Hossain et al, 1996](#)).

### **Funktion des CD23 Rezeptors bei allergischen Erkrankungen**

Ein weiterer bedeutender, jedoch kontrovers diskutierter Mechanismus der IgE Synthese wird durch den Niedrig-affinen Rezeptor für IgE (CD23) und seinen Liganden CD21 reguliert ([Aubry et al, 1992](#)). IgE bindet an zwei Klassen von IgE Rezeptoren, den „high-“ (Fc $\epsilon$ RI) und den „low-affinity“ (Fc $\epsilon$ RII oder CD23) Rezeptor. Die allergische Reaktion vom Soforttyp wird ausgelöst durch die Kreuzvernetzung von IgE Molekülen gebunden an den „high-affinity“ Rezeptor auf Mastzellen oder basophilen Granulozyten. In der Maus ist CD23 exprimiert auf B-Zellen, Makrophagen und Dendritischen Zellen.

Yu *et al.* zeigten 1994 in der Maus, daß die Bindung von IgE an den CD23 Rezeptor auf B Zellen zu einer negativen Feedback Regulation der Immunglobulinsynthese und damit zur Begrenzung der IgE Synthese führt ([Yu et al, 1994](#)). Flores-Romo *et al.* konnten demonstrieren, daß die spezifische IgE Synthese mit einem anti-CD23 Antikörper unterdrückt wird, was für einen positiven Feedback Mechanismus spricht ([Flores-Romo et al, 1993](#), [Gustavson et al, 1994](#)). In einem Parasiten-Infektionsmodell hingegen konnte kein Unterschied in der IgE Produktion zwischen Wildtype (Wt, CD23+/+) und CD23 Knock Out (CD23-/-) Mäusen gefunden werden ([Stief et al, 1994](#)).

Die Rolle von IgE gebunden an den „low-affinity“ Rezeptor ist bisher unklar. Insbesondere von Mudde *et al.* wurde postuliert, daß die Expression des „low-affinity“ IgE Rezeptors eine entscheidende Rolle in der Entwicklung einer allergenspezifischen T-Zell-Antwort spielt. Dies wird dadurch erklärt, daß antigenpräsentierende Zellen, die CD23 auf der Oberfläche tragen, in der Lage sind, allergenspezifische IgE-Antikörper zu binden und über diese IgE-Antikörper Allergene in spezifischer Weise präsentieren können. Diese Resultate beruhen bis zum gegenwärtigen Zeitpunkt auf *in vitro* Experimenten ([Mudde et al. 1995](#)).

Im Plasma atopischer Patienten korreliert die Konzentration von löslichem CD23 (soluble: sCD23) in der BAL mit den Serum IgE Antikörpertitern ([Bujanowski-Weber et al, 1990](#)) und dem Grad der Inflammation in der Lunge ([Walker et al, 1992](#)). *In vitro* reguliert sCD23 die Produktion der proinflammatorischen Zytokine Tumor Nekrose Faktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) und IL-6 ([Lecoanet-Henchoz et al, 1995](#); [Herbelin et al, 1994](#); [Armant et al, 1994](#)). Die Expression von CD23 auf humanen peripheren Blutlymphozyten nach Allergenkontakt und erfolgter allergischer Sensibilisierung wird synergistisch durch IL-4 verstärkt ([Pfeil et al, 1989](#)) und in Patienten mit schwerer Atopischer Dermatitis wurde eine erhöhte Expression von CD23 auf B Zellen beobachtet ([Sakamoto et al, 1992](#)). Diese Fakten belegen einen Einfluß von CD23 in der Induktion der allergischen Sensibilisierung als Feed-Back-Regulator der IgE Produktion und der sezernierten Menge an IgE. Morphologische und funktionelle Veränderungen beim AB, getriggert durch proinflammatorische Zytokine, stehen durch den CD23 Rezeptor mit der IgE Produktion in Zusammenhang, was für eine essentielle Rolle dieses „Low-Affinity“ IgE Rezeptors sowohl in der Induktion als auch in der Exazerbation allergischer Inflammation spricht. Die kontroversen Daten zeigen die Notwendigkeit weiterer Untersuchungen der zugrundeliegenden Regulationsmechanismen und der Funktion dieses bedeutenden Moleküls.

## **TNF- $\alpha$**

TNF- $\alpha$  wird von Makrophagen, Lymphozyten, Mastzellen, Eosinophilen und Bronchialepithel produziert. Es kann in der BAL von Asthmatikern in erhöhter Konzentration nachgewiesen werden ([Broide et al, 1992](#)). Die Infusion von TNF- $\alpha$  bedingt in Ratten eine erhöhte Atemreaktivität ([Kips et al, 1992](#)), und die Inhalation führt bei nicht allergischen Versuchspersonen nach 24 h zu bronchialer Hyperreagibilität ([Yates et al, 1993](#)). Von großer Relevanz ist weiterhin die Induktion der ICAM-1 ([Tosi et al, 1992](#)) und VCAM-1 Expression auf Endothelzellen ([Thornhill et al, 1991](#)), wodurch die Migration von Leukozyten und Eosinophilen aus dem Blutstrom in die Lunge getriggert wird. *In Vitro* konnte für die VCAM-1 Expression auf Endothelzellen eine schnelle Hochregulation durch TNF- $\alpha$  gezeigt werden. Die Dauer der Expression kann durch IL-4 deutlich verlängert werden, womit eine synergistische Wirkung von TNF- $\alpha$  bei der allergischen Inflammation evident erscheint ([Iademarco et al, 1995](#)).

TNF- $\alpha$  spielt auch eine bedeutende Rolle in der Induktion der spezifischen Endotheladhesion von Eosinophilen, da es die  $\beta_2$  Integrine CD11/CD18 und ICAM-1 - Expression hochreguliert ([Goddling et al, 1995](#); [Lukacs et al, 1995](#)). Entsprechend zeigen aus Asthmapatienten gewonnene Eosinophile *in vitro* eine gesteigerte Adhäsion an Gefäßendothelzellen via VCAM-1 und ICAM-1 ([Hakansson et al, 1995](#)).

Nach IgE Triggering produzieren Epithelzellen und Lungenmastzellen in sensibilisierten Lungen verstärkt TNF- $\alpha$  ([Ohno et al, 1990](#)), welches die Epithelzellen zur Produktion weiterer Zytokine (IL-8, IL-6, GM-CSF) stimuliert ([Cromwell et al, 1992](#)). Diese Daten belegen die herausragende Rolle des TNF- $\alpha$  für die allergische Inflammation, da sich alle Asthma - Symptome und die peribronchiale Inflammation im Tiermodell durch dieses Zytokin induzieren lassen. Der Nachweis einer möglichen Rolle von TNF- $\alpha$  bei der Superantigen vermittelten Aktivierung von Alveolarmakrophagen ist ein Teil der vorliegenden Arbeit.

## **Ziel der Arbeit**

1. Triggern Superantigene eine IgE-unabhängige aber entzündungsabhängige Form der bronchialen Hyperreagibilität ( als Modell des intrinsisches AB).
2. Besteht eine synergistische Interaktion zwischen allergen-getriggerten IgE-abhängigen Entzündungsreaktionen (extrinsischem AB) und den Effekten von Superantigenen?
3. Können Superantigene die allergenvermittelte allergische Entzündungsreaktion und bronchiale Hyperreagibilität steigern ? Diese Frage hat insbesondere deshalb besondere Bedeutung, weil bei vielen Patienten ein Nebeneinander zwischen IgE- abhängigen und unabhängigen Auslösern bei Exazerbation aufgefunden werden und diese möglicherweise zur Chronifizierung entscheidend beitragen können.
4. Welche Rolle spielt der niedrig-affine IgE Rezeptors (CD23) für die Ausbildung der IgE-Anwort und für die Ausbildung der bronchialen Hyperreagibilität.
5. Ist die Entstehung der bronchialen Hyperreagibilität abhängig von der lokalen Produktion von TNF- $\alpha$ ?



# Material und Methoden

## Tiere und Behandlungsprotokolle

Für die Experimente wurden weibliche C57BL/6 Mäuse (Harlan Winkelmann GmbH, Borcheln) im Alter von 8 - 10 Wochen verwendet. Um den Einfluß des Low affinity receptors für IgE zu untersuchen, wurden transgene Mäuse verwendet, denen das Gen für den CD23 Rezeptor aus der Keimbahn entfernt wurde (C57BL/6 CD23 <sup>-/-</sup>). Diese wurden uns über die Arbeitsgruppe Dr. Lamers vom Max-Planck-Institut für Immunbiologie, Freiburg, im Rahmen einer Kooperation zur Verfügung gestellt. Da die transgenen Tiere auf der Basis der C57BL/6 Wildtype (Wt) Mäuse generiert wurden lassen sich alle beobachteten Effekte ausschließlich auf das Fehlen des CD23 Rezeptors (des Gens für den Rezeptor) zurückführen, der gesamte übrige genetische Background ist identisch ([Yu et al. 1994](#)).

## Immunisierung

Als Allergen wurde Ovalbumin (10µg OVA Grade IV, Sigma Chemicals, Deisenhofen) verwendet. Um die Immunantwort zu verstärken, wurde die systemische Allergenapplikation mit Imject Alum (1,5mg Al(OH)<sub>3</sub>, Pierce, Rockford) als Adjuvans durchgeführt, um die Antikörperproduktion zu verstärken.

## Lokale Allergenchallenge mittels Aerosol

24 h und 12 h vor der Analyse wurde eine lokale Allergenprovokation durchgeführt, um in der Lunge eine Vernetzung von antigenspezifischen Immunglobulinen zu induzieren, was eine allergische Reaktion vom Soforttyp auslöst ([Renz et al, 1992](#)). Die Mäuse wurden in einer ca. 20 x 20 x 15 cm großen Plastikkammer über eine Dauer von 30 Minuten einer aerosolisierten OVA Lösung (5ml, 10 µg/ml) ausgesetzt, die durch Ultraschallverneblung erzeugt wurde. Das durch diese Vernebelung erzeugte Aerosol besitzt eine Tropfengröße, die beim normalen Atmen die Alveolen in der Lungenperipherie erreicht. Als Lösungsmittel diente wiederum PBS, die kontinuierliche Allergenzufuhr wurde durch einen Kompressor sichergestellt (Pariboy, Pari, Starnberg, FRG).

## Narkose und Nasalapplikation

Alle im Material und Methoden Teil aufgeführten Behandlungen und *in vivo* Versuche wurden parallel und mit gleichen Protokollen für C57BL/6 Wt und CD23 <sup>-/-</sup> Mäuse durchgeführt.

## Narkose

Um den lokalen Einfluß bakteriellen Superantigens in der Lunge zu untersuchen, wurden eine einfache und sichere Methode etabliert, um die Mäuse über die Nase mit einer SEB Lösung zu behandeln (Toxin Technologie; Sarasota, Florida).

Zur Minimierung des Schluckreflexes wurden die Mäuse anästhesiert. Die Narkose erfolgt mit Ketanest 100mg/kg KG (Parke-Davis; Berlin) und 10µl Rompun (Bayer AG, Leverkusen) in 250µl sterilem 0,9% NaCl, das i. m. in den Oberschenkel injiziert wird.

### Nasale Applikation von Flüssigkeiten

Nach Eintritt der Narkose (ca. 5 min) kann die nasale Applikation erfolgen. Mit einer Pipette werden 25µl Flüssigkeit alternierend auf die Nasenlöcher der Maus gegeben. Unter Narkose wird die Flüssigkeit vollständig in die Lunge aspiriert. Nach 2 min werden weitere 25µl Flüssigkeit appliziert. Zum Nachweis der Aspiration in die Lunge wurde den Mäusen 50µl einer Evans Blue Lösung 1% (w/v; Sigma Chemicals, Deisenhofen) appliziert. Nach 15 Minuten wurden die Mäuse getötet und die Blaufärbung der Lunge dokumentiert, die die erfolgte Aspiration der nasal applizierten Flüssigkeit in die Lunge anzeigt.

Für die Induktion der allergischen Entzündung in der Lunge wurden die angegebenen Konzentrationen SEB (0,05ng - 500ng) steril in 50µl PBS gelöst und über die Nase appliziert, als Kontrolle wurde steriles PBS eingesetzt.

### Behandlungsschema der Mäuse

Zur Ermittlung der niedrigsten Superantigenkonzentration, die als Schwellenwert nach nasaler Applikation (Appl) noch einen proinflammatorischen Effekt hat, wurde eine Titration der SEB - Konzentration durchgeführt. Die Mäuse wurden am Tag 1, 3 und 6 mit SEB in 50µl PBS behandelt (5-6 Tiere/Gruppe, alle Experimente wurden mindestens zwei mal wiederholt). Die applizierte Menge in den sechs verschiedenen Studiengruppen reichte von 0,05ng/Apl bis 500ng/Apl. Als Kontrolle wurde eine Gruppe unbehandelt (Nil) und eine Gruppe nach dreimaliger Behandlung mit 50µl PBS analysiert. Diese lokale Behandlung induzierte keine systemischen anti-SEB Antikörper (gemessen mit ELISA und Intrakutantest, [Herz et al, 1999](#)). Damit sind die proinflammatorischen Effekte in der Lunge auf das Wirken des Superantigens und nicht auf Ak-vermittelte Reaktionen zurückzuführen.

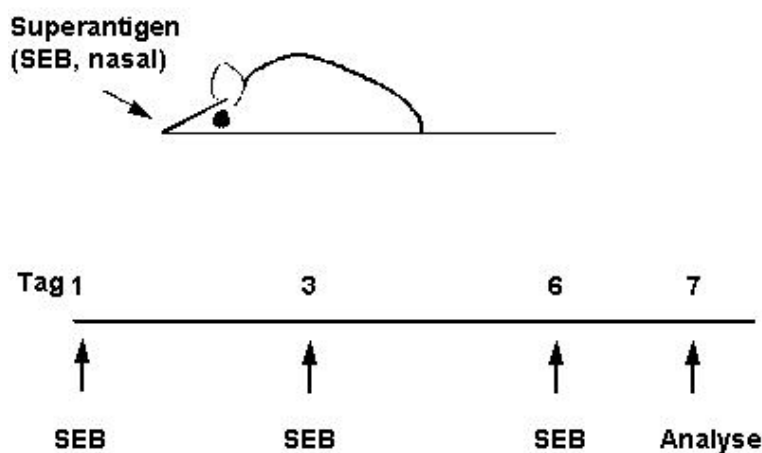


Abb. 4:

Protokoll der nasalen Applikation von SEB am Tag 1, 3, und 6 zur Titration der Konzentration. Am Tag 7 wurden die Tiere analysiert, d.h. eine Bronchiallavage und Histologie der Lunge durchgeführt.

### Allergische Sensibilisierung gegen Ovalbumin (OVA)

C57BL/6 Wt und CD23<sup>-/-</sup> Mäuse wurden durch intraperitoneale OVA Injektion an den Tagen 1, 7 und 14 sensibilisiert mit 10µg OVA/Injektion (Grade IV; Sigma Chemical, Deisenhofen, FRG) emulsiert mit 1,5mg Al(OH)<sub>3</sub> (Imject Alum, Pierce, Rockford). Kontrollen wurden mit 1,5mg Al(OH)<sub>3</sub> ohne Zusatz von OVA injiziert.

Zum Ausschluß unspezifischer Reaktionen in der Lunge durch das SEB Lösungsmittel (PBS) wurden auch in dieser Gruppe alle Tiere nasal mit PBS behandelt Als Lösungsmittel diente steriles PBS.

Am Tag vor der Analyse wurde eine Allergenchallenge wie beschrieben durchgeführt.

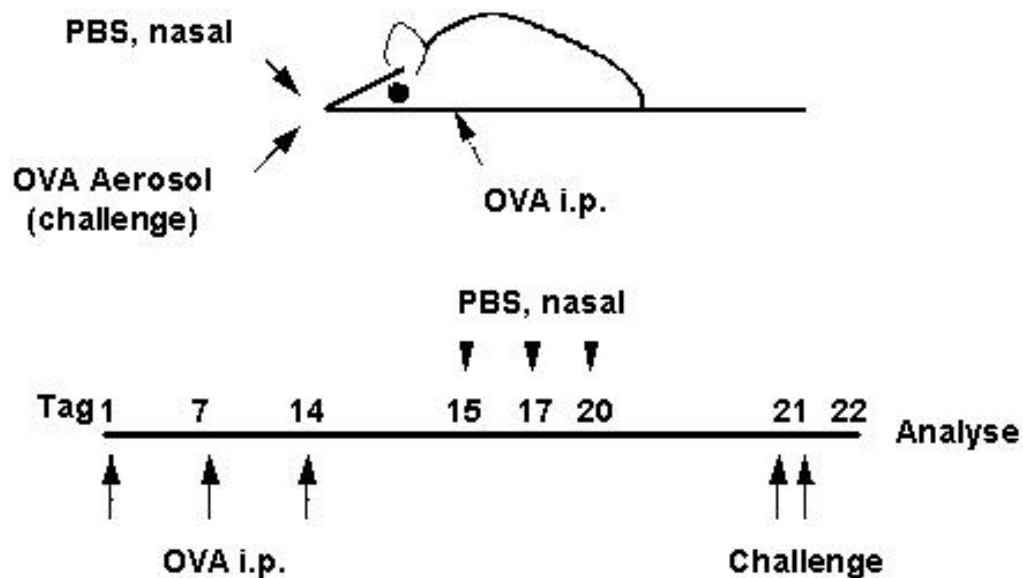


Abb. 5:

Protokoll der intraperitonealen OVA Sensibilisierung am Tag 1, 7, und 14 mit zusätzlicher nasaler SEB Applikation.

### Additive Behandlung der OVA sensibilisierten Tiere mit nasal appliziertem SEB

Die Mäuse dieser Untersuchungsgruppe erhielten am Tag 1, 7 und 14 eine intraperitoneale OVA Injektion wie beschrieben. Am Tag 15, 17 und 20 wurde unter Narkose 50ng SEB (die durch Titration bestimmte Schwellenkonzentration, die gerade noch einen inflammatorischen Effekt hat) appliziert. Am Tag 21 wurden im Abstand von 12 h zwei OVA Challenges durchgeführt, am Tag 22 erfolgte die Analyse.

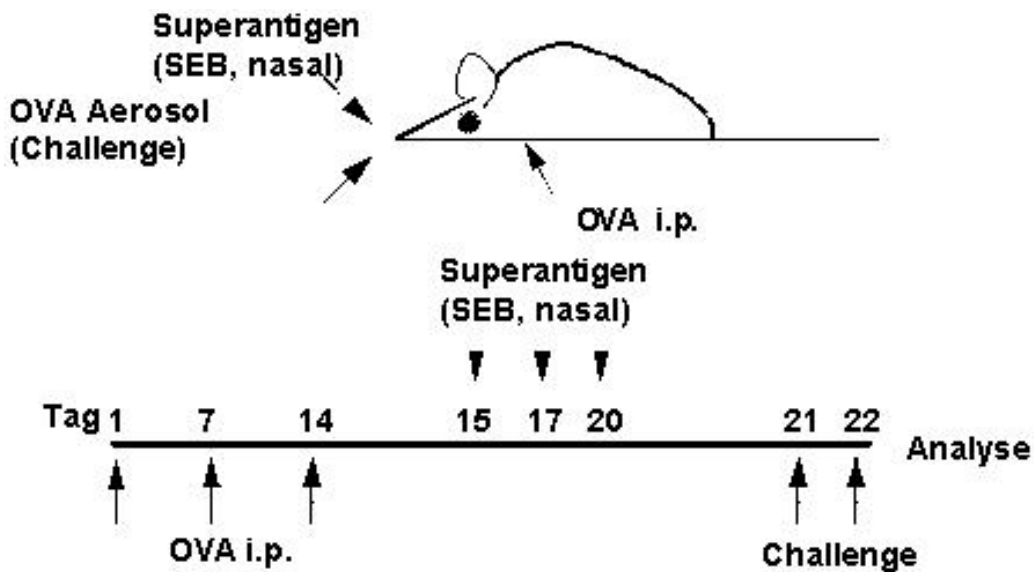


Abb. 6:

Protokoll der OVA Sensibilisierung mit zusätzlicher nasaler SEB Applikation am Tag 15, 17 und 20 als zusätzlicher Triggerfaktor der allergischen Inflammation.

### Präparation der Tiere

Am Tag 22 wurden die Mäuse durch zervikale Dislokation getötet. Der Zervikalbereich über der Trachea wurde durch einen Medianschnitt eröffnet, umliegendes Gewebe wurde entfernt und ein Trachealsegment von etwa 0,5 cm Länge entnommen. Die Trachea wurde zwischen zwei Triangeln fixiert (Maus-Trachealhaken Größe 0) (HSE, March-Hugstetten) und zur Bestimmung der bronchialen Hyperreagibilität in ein Organbad überführt.

Vor Öffnen des Peritonealraumes wurde die Maus mit 70%igem Alkohol desinfiziert und die Milz unter aseptischen Bedingungen entnommen.

### Histologie der Lunge

Zum Nachweis der Inflammation wurden histologische Schnitte angefertigt.

Die Maus wurde getötet, der Thorax eröffnet und die Trachea freigelegt. Mit einer Kanüle wurden 800µl 3,7% Formalin (v/v) in die Lunge injiziert. Diese wurde entnommen, in der Formalinlösung 24h fixiert, in Paraffin eingebettet und in 5µm dicke Segmente geschnitten. Die Schnitte wurden mit HE gefärbt und eingebettet. Die Abbildungen zeigen repräsentative Lungenareale bei 200- oder 400-facher Vergrößerung, die Fotos wurden auf Kodak Ektachrome 100HC angefertigt.

### Durchführung der bronchoalveolaren Lavage

Bronchiallavagen (BAL) stellen eine verbreitete klinische Methode zur Gewinnung von Untersuchungsmaterialien aus den Bronchiolen und den terminalen Alveolen dar. Es erfolgt eine Spülung

der Lunge mit PBS, wodurch Zellen und lösliche Bestandteile aus dem Respirationstrakt der klinischen Untersuchung zugänglich gemacht werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Durchführung der BAL an diesem Mausmodell etabliert.

Um eine sichere und kontrollierte Durchführung der BAL zu ermöglichen wird bei der Maus die Lunge freigelegt und die Trachea in ihrem gesamten Verlauf dargestellt.

Zur besseren Handhabung kann die Kanülenspitze (5mm) um 70° gebogen werden. Unter Sichtkontrolle wird eine 40x0.50mm Kanüle bis vor die Bifurkation in die Trachea eingeführt. 800 µl PBS (4°C) werden langsam in die Lunge injiziert, aspiriert und auf Eis aufbewahrt. Die BAL wird mit weiteren 800µl frischer PBS Lösung wiederholt. So kann ca. 1,4ml Untersuchungsmaterial mit etwa  $1-3 \times 10^5$  Zellen gewonnen werden, die genaue Menge wurde durch Wiegen bestimmt. Ein Teil der gewonnenen BAL Fluid wurde zum Anfertigen von Zytospins verwendet (2.4.3), die verbleibende Menge wurde zentrifugiert um die Zellen zu entfernen (2200rpm, 20min). Die zellfreie BAL-Fluid wurde bis zur weiteren Analyse bei -20°C gelagert. Nach der Lavage wurden an der Lunge b.z.w. der Trachea keine weiteren Untersuchungen vorgenommen.

### **Zytozentrifugation der durch die BAL gewonnenen Zellen**

Die Zytozentrifugation ist ein Verfahren zur Anreicherung und Fixierung von Zellen zur histologischen Untersuchung auf Standard-Objektträgern.

Mit 25µl und 50µl der BAL wurden Cytospins angefertigt. Die Objektträger wurden ca. 30min staubfrei an der Luft getrocknet, die Zellen wurden mit Diff - Quick (Baxter-Chemicals) entsprechend den Herstellerangaben gefärbt. Die Differenzierung der Zellen nach Lymphozyten, Eosinophilen, Neutrophilen und Makrophagen wurde bei 1000-facher Vergrößerung nach morphologischen Kriterien vorgenommen.

### **Quantitative Antikörperbestimmung mittels Enzyme-Linked Immuno Sorbant Assay (ELISA)**

Zu Beginn (Tag 0) und am Ende eines Sensibilisierungsprotokolls (Tag 22) wurde von jeder Maus Blut aus einer Schwanzvene entnommen. Nach kompletter Gerinnung (ca. 30-60min bei Raumtemperatur) wurde durch Zentrifugation (12000rpm, 15min) Serum gewonnen. Die Antikörperproduktion in vivo wurde mittels eines indirekten ELISA untersucht.

Antigen bzw. primäre Antikörper werden durch Adsorptionseffekte an die Mikrotiterplatte angelagert (Coating). Nach Entfernung von nicht gebundenen Antikörpern wird die Platte mit einem Protein (Fetales Kälberserum) abgesättigt, damit keine weitere unspezifische Bindung erfolgen kann (Blocking). In einem zweiten Schritt erfolgt dann die Inkubation mit dem Antikörper-haltigen Serum. Die an das Antigen auf der ELISA-Platte gebundenen Antikörper werden in einem dritten Schritt (indirekt) durch Inkubation mit einem Anti-Immunglobulin-Reagenz nachgewiesen. Dieses ist mit einem Enzym markiert, welches sich mit p-Nitrophenyl-Phosphat (Sigma, Deisenhofen, FRG) durch eine Farbreaktion quantifizieren läßt.

Für das OVA Tiermodell wurden in unserem Labor ELISA Systeme zur Bestimmung von Gesamt-IgE sowie von OVA - spezifischem IgE, IgG 1 und IgG 2a etabliert. Alle aufgeführten AK wurden von der Fa. Pharmingen, Hamburg bezogen.

### **Durchführung des ELISA zur Bestimmung des Gesamt-IgE**

Mikrotiterplatte:	96-Well (Greiner, Nürtingen)
Primärer Ak:	a-IgE (02121 D) (Pharmingen, San Diego, USA) Stocklösung: 1 mg/ml (0,5 µg/well); Verd. 1:100 in coating-Puffer
Blocking:	2% BSA/PBS; pH 7,0
Standard:	IgE (03121 D) (Pharmingen) Stocklösung: 0,5 mg/ml Standardreihe: 10 µg/ml - 0,015 µg/ml
Sekundärer Ak:	a-IgE-Biotin (02132 D) Stocklösung: 0,5 mg/ml; Verd. 1:200 Streptavidin-alk. Phosphatase (Jackson Immuno Research Lab, West Grove, USA); Stocklösung: 1 mg/ml; Verd. 1:500
Substrat:	p-Nitrophenyl-Phosphat (Sigma, Deisenhofen) 500 µg/ml
Verdünnungspuffer:	0,5% BSA/PBS; pH 8,2
Waschpuffer:	PBS/Tween 0,1%; pH 7,0
Messung:	bei 405 nm gegen Referenzfilter 490nm

### **ELISA zur Bestimmung von OVA-spezifischem IgE, IgG1 und IgG2a**

Primärer Ak:	OVA (Sigma Chemical) in coating-Puffer
Blocking:	10% FKS/RPMI; pH 8,2
Standard:	Serum aus OVA immunisierten BALB/c, 1ml=2000 ELISA-Einheiten (EU)
Sekundärer Ak:	a-IgE                      a-IgG1                      a-IgG2a

	(Pharmingen) (Pharmingen) (Pharmingen)
	Verd. 1:200 Verd. 1:200 Verd. 1:200
Substrat:	p-Nitrophenyl-Phosphat (Sigma) 500 µg/ml
Verdünnungspuffer:	2,5% FKS/RPMI; pH 8,2
Waschpuffer:	PBS/Tween 0,1%; pH 7,0
<u>Vorgehen:</u>	
Coaten:	prim. Ak oder Allergen in coating-Puffer; 50 µl/well; 4 °C über Nacht
Waschen:	Waschpuffer 3x; vor Substratzugabe 5-10x
Blocken:	mit Blockingpuffer; 100 µl/well; 2h bei 37 <sup>0</sup> C
Waschen:	Waschpuffer 3x
Standard:	verdünnt in Verdünnungspuffer; für OVA - spezifisches IgE 1:2 verdünnen; für IgG1/2a 1:4 bis 1:25 verdünnen; 50 µl/well;  4 <sup>0</sup> C über Nacht oder 2h bei 37 <sup>0</sup> C
Waschen:	Waschpuffer 3x
Sek. Ak:	in Verdünnungspuffer 1:200; 50 µl/well; 2h bei 37 <sup>0</sup> C
Waschen:	Waschpuffer 3x
Biotinierter sek. Ak:	Inkubation mit Streptavidin-AP 1:500; 1h bei 37 <sup>0</sup> C
Waschen:	Waschpuffer 8x
Substrat:	500 µg/ml in Substratpuffer

### **Protokolle der IL-4, IL-5 und IFN-γ Zytokin - ELISA**

Interleukine und IFN-γ spielen eine bedeutende Rolle bei dem lokalen Entzündungsgeschehen in der

Lunge. Der Nachweis der lokal wirkenden Zytokine wurde in der zellfreien BAL - Fluid mittels folgender ELISA durchgeführt.

Mikrotiterplatte:	96-Well (Nunc Maxi-Sorb Micro Well Module)
Primärer Ak:	Purified rat anti-mouse IL-4 (18031D) Purified rat anti-mouse IL-5 (18051D) Purified rat anti-mouse IFN- $\gamma$ (18181D) Inkubation: 12h; 4°C
Blocking:	3% BSA/PBS; pH 7,0
Standard:	Recombinant mouse IL-4 (19231W) Recombinant mouse IL-5 (19241W) Recombinant mouse IFN- $\gamma$ (19301U) Inkubation: 2h bei 37°C
Sekundärer Ak:	Biotinylated rat anti-mouse IL-4 (18042D) Biotinylated rat anti-mouse IL-5 (18062D) Biotinylated rat anti-mouse IFN $\gamma$ (18112D) Inkubation: 1h; RT
Substrat:	150 $\mu$ l TMB 1:100 (Fluka; 87748), Farbreaktion: 20min
Stoppen:	50 $\mu$ l 2M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
Messung:	bei 450 nm; Referenzfilter: 490nm

Die Nachweisgrenzen betrugen 10ng/ml für IL-4, 30pg/ml für IL-5 und 100pg/ml für IFN- $\gamma$ .

Die TNF- $\alpha$  Konzentration in der BAL wurde mit einem murine TNF- $\alpha$  ELISA Kit (Laboserv, Giessen) nach den Instruktionen des Herstellers gemessen. Die Nachweisgrenze lag bei 20pg/ml.

### **Messung der bronchialen Hyperreagibilität**

Zur Analyse der Atemreaktivitätslage stand im Labor ein *in vitro* Testsystem zur Verfügung, welches ursprünglich in Denver etabliert wurde ([Larsen et al](#), 1992). Dabei wird die Kontraktion der glatten Trachealmuskulatur mittels elektrischer Feldstimulation (EFS) gemessen.

Zwölf Stunden nach der letzten Lokalprovokation mit Allergen über die Atemwege wurden die Mäuse getötet und die Trachealsegmente (TSM) freipräpariert. Ein ca., 0,5 cm langes Stück der Trachea wurde



entnommen, in horizontaler Position zwischen zwei rostfreie Drahttriangeln (Mausgröße 0) (HSE, March-Hugstetten) eingehängt und in ein 20 ml Gewebebad (Kent Scientific, Litchfield, CT, USA) überführt. Die untere Triangel wurde über einen Draht in eine Glasöse an der Basis des Gewebebads eingeführt, die obere über eine Goldkette an einem FT.03 isometrischen Spannungsmesser (Grass Instruments, Quincy, MA, USA) fixiert.

Das Gewebebad bestand aus Krebs-Henseleit-Puffer (Sigma, Deisenhofen) folgender Zusammensetzung (mM): 118 NaCl, 25 NaHCO<sub>3</sub>, 2,8 CaCl<sub>2</sub> 2 H<sub>2</sub>O, 1,17 MgSO<sub>4</sub>, 4,7 KCL, 1,2 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> und 2 g/Liter Dextrose. Das Bad wurde kontinuierlich mit einem 95% O<sub>2</sub> - 5% CO<sub>2</sub> Gasgemisch versorgt. Der pH-Wert wurde auf 7,4 eingestellt, die Temperatur des Wasserbads betrug 37°C. Somit herrschten über die gesamte Dauer der Messung physiologische Bedingungen. Der Puffer wurde in regelmäßigen Abständen gewechselt. Jedes TSM wurde in einer Vorspannung von 1 g 60 Minuten lang im Gewebebad äquilibriert. Anschließend wurde zur Vitalitätskontrolle eine KCL Stimulation (120 mM) durchgeführt, nach Erreichen der Maximalkontraktion wurde ein Pufferwechsel durchgeführt.

Die EFS wurde über einen Grass S48 Stimulator durchgeführt, welcher mit einer Konstantstromquelle (Stimu-Splitter II, STAG Instruments, Oxon, GB) verbunden war. Der elektrische Reiz erreichte die TSM transmural über zwei Platinelektroden (2,5 cm<sup>2</sup>) (HSE, March-Hugstetten), welche parallel zu dem TSM in das Gewebebad eingebracht wurden.

Die optimale Stimulationsdauer für jedes TSM wurde ermittelt durch Bestimmung seiner Maximalkontraktion bei folgenden EFS-Parametern: 200 mA, 2 ms Pulsdauer und 30 Hz Stimulationsfrequenz. Die Stromspannung, die zu einer optimalen dose-response führt, ist abhängig von der Ausgangsreaktivitätslage und damit je nach Mausstamm unterschiedlich. Für die C57/BL6 konnte durch Vorversuche ein Optimum bei 12 V ermittelt werden.

Die einzelnen Stimulationen wurden in ansteigenden Frequenzen von 0,5 bis 30 Hz durchgeführt. Stimuliert wurde jeweils so lange, bis eine maximale Kontraktionsantwort erreicht war. Nach jeder Stimulation wurde eine zweiminütige Erholungspause eingehalten.

Die Kontraktionen der TSM wurden von einem Actagraph-Rekorder (Esaotebiomedica, Firenze, Italien) aufgezeichnet.

Nach der Messung wurden aus den einzelnen Kontraktilitätskurven der TSM die Frequenz ermittelt, bei der 50% der Maximalkontraktion erreicht wurden und als ES 50 dokumentiert.

## **Statistische Auswertung der Ergebnisse**

Signifikanzen wurden mit dem Student t bzw. dem Mann-Whitney-U Test für unabhängige Stichproben berechnet. Die Daten wurden entsprechend ihres Konfidenzintervalls als signifikant (\*) bei p<0,05 und als hochsignifikant (\*\*) bei p<0.01 bezeichnet

# ERGEBNISSE

## **Aspiration nasal applizierter Reagenzien in die Lungenperipherie**

Um die Deposition von flüssigen Reagenzien in die Lunge sicherzustellen wurde eine einfache Methode zur Instillation von Flüssigkeiten über die Nase etabliert.

Die wurden Tiere mit einem Ketanest/Rompun Gemisch narkotisiert. Nach Erreichen des Toleranzstadiums wurden 50µl Evans Blue Farblösung auf die Nase appliziert. Da Mäuse obligat durch die Nase atmen, wird die Lösung bis in die Lungenperipherie aspiriert (Abb. 7). Damit wurde sichergestellt, daß in folgenden Experimenten verwendetes SEB die Atemwege passiert.



Abb. 7:

Die nasale Applikation von Reagenzien führt zur Deposition der Lösung bis in die Lungenperipherie. 50µl einer Evans Blue Lösung (1% w/v) wurden unter Narkose in die Nase appliziert, die Präparation erfolgte nach 15min (x 5).

### SEB Titration: Modell des intrinsischen AB

Zur Untersuchung des Einflusses von bakteriellem Superantigen als Triggerfaktor der allergischen Inflammation wurde Staphylococcal enterotoxin B (SEB) als gut charakterisierte und analysierte Modellschubstanz eingesetzt, für die bereits eine pathophysiologische Relevanz bei atopischen Prozessen gezeigt werden konnte ([Leyden et al, 1974](#); [Leung et al, 1993 b](#)). SEB führt zu einer MHC Klasse II-abhängigen Aktivierung von CD4 T-Zellen durch die spezifische Bindung an diese beiden Rezeptoren. In der Lunge exprimieren Alveolarmakrophagen, Dendritische Zellen und Bronchialepithel MHC Klasse II Rezeptoren und sind damit in der Lage die Superantigenwirkung auf die durch CD4 T-Zellen bestimmte allergische Inflammation zu vermitteln.

Um den Einfluß des Superantigens *in vivo* zu untersuchen, wurde eine Titration durchgeführt. Ziel war es, die Konzentration zu bestimmen, die bei der nasalen Applikation gerade noch eine nachweisbare Inflammation ohne neutrophile Komponente in der Lunge induzierte. Der Effekt des SEB auf die Inflammation und die Zytokinproduktion wurde untersucht. Weitere Experimente wurden mit dieser SEB Konzentration durchgeführt um den spezifischen Einfluß des Superantigens auf eine bestehende allergische Inflammation zu untersuchen.

### Dosisabhängiger Anstieg der Gesamtzellzahl in der BAL

Als primäres Untersuchungsmedium wurde Bronchiallavageflüssigkeit analysiert. Der erste Indikator einer Inflammation ist die Gesamtzellzahl (Abb. 8), die den Influx Mono- und Polymorphkerniger Leukozyten repräsentiert. Die dreimalige nasale Applikation des Lösungsmittels (**PBS**) induziert keinen signifikanten Anstieg der Zellzahl im Vergleich zu völlig unbehandelten Tieren (**Nil**) ( $99.800 \pm 21.200$  gegen  $130.000 \pm 14.800$  Zellen/BAL). Damit ist ein unspezifischer, irritativer Effekt der nasal applizierten Lösung ausgeschlossen. Die niedrigste wirksame Konzentration an SEB, die einen signifikanten Anstieg der Gesamtzellzahl in der BAL induzierte war 50ng SEB/Applikation ( $281.000 \pm 48.000$  Zellen/BAL;  $p \leq 0,05$ ).

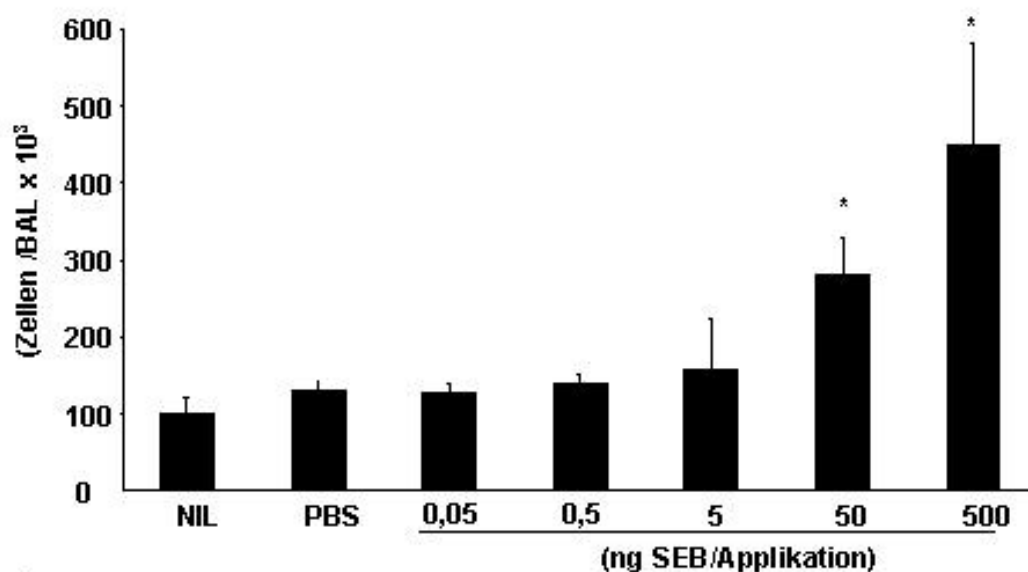


Abb. 8:

Anstieg der Gesamtzellzahl in der BAL von C57Bl/6 Mäusen. Die Kontrollgruppe (Nil) wurde nicht behandelt. Die weiteren Gruppen wurden am Tag 1, 3 und 6 unter Narkose mit 50µl PBS bzw. 50 µl SEB/PBS Lösung in den angegebenen Konzentrationen behandelt. Die BAL wurde nach 24 h, wie in Material und Methoden beschrieben, durchgeführt. Statische Signifikanz, verglichen zur negativen Kontrolle, (\*  $p \leq 0,05$ ) wurde mit Student t Test berechnet.

### **Zelldifferenzierung der BAL Zellen**

Die Analyse der Zellsubpopulationen (Abb. 9), in der BAL, zeigt einen dosisabhängig Influx von Lymphozyten, Eosinophilen und Neutrophilen Granulozyten. Lymphozyten (**A**) erreichten ab 50ng/Applikation ein signifikant erhöhtes Plateau bei 50.000 Zellen/BAL, die Zahl der Eosinophilen (**B**) erreichte bei 50ng einen Höchstwert und fiel mit steigender Konzentration leicht ab während die Neutrophilen Granulozyten (**C**) ab 50ng/Appl einen exponentiellen, dosisabhängig Anstieg zeigten. Alveolarmakrophagen stellten den größten Anteil der BAL, andererseits konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Kontrolltieren und den mit SEB behandelten Tieren festgestellt werden (**D**). Das Ziel der Titration bestand in der Bestimmung der geringsten SEB Konzentration, die eine allergische Inflammation triggern könnte, welche vor allem durch den Anstieg von Eosinophilen und Lymphozyten in der BAL gekennzeichnet ist. Nach Bestimmung der Gesamtzellzahl und der Zelldifferenzierung zeigte sich, daß 50ng SEB/Applikation als optimale Menge den geforderten Punkten entsprach, und somit in den weiteren Experimenten mit sensibilisierten Tieren als zusätzlicher proinflammatorischer Stimulus eingesetzt werden kann.

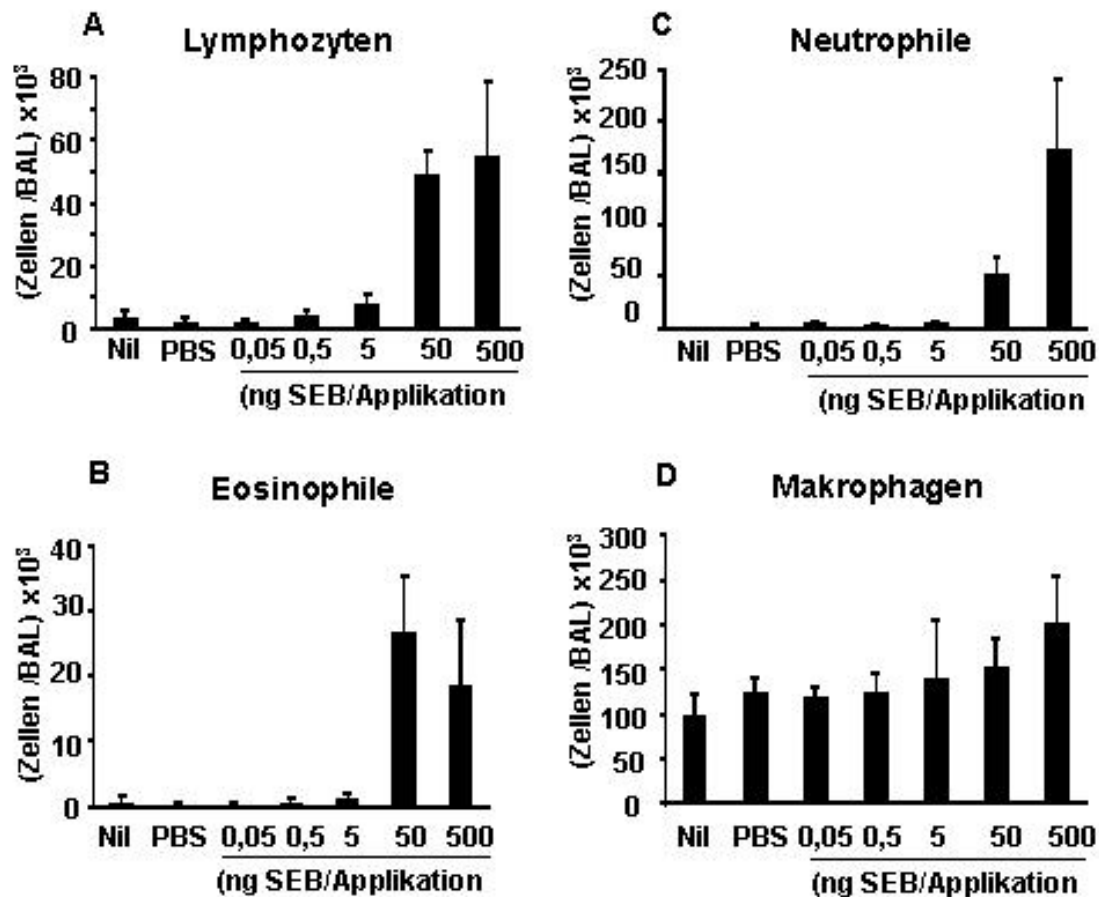
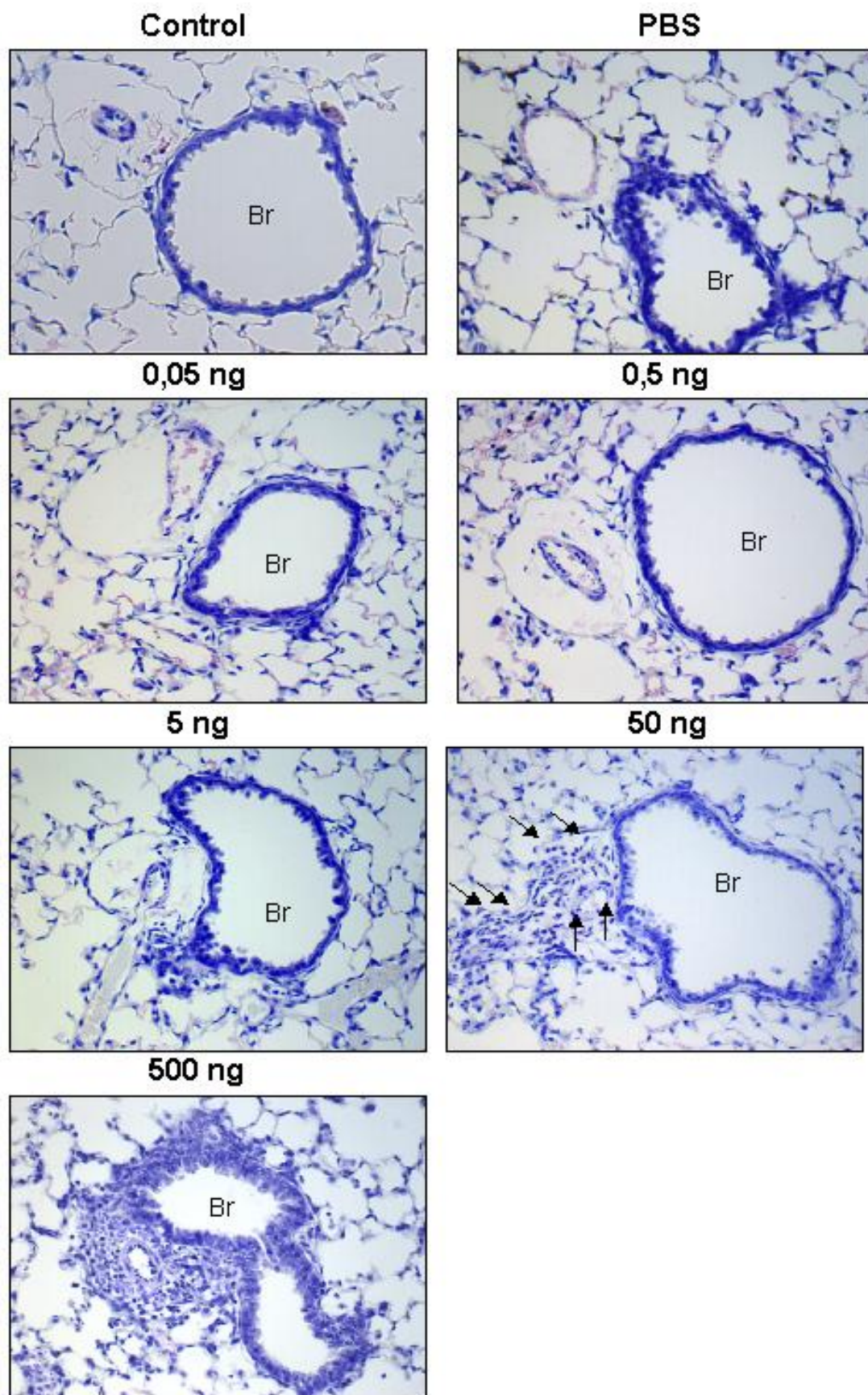


Abb. 9:

Dosisabhängige Inflammation der Atemwege nach SEB-Applikation. Absolutzellzahl in der BAL/Maus nach i.n. SEB Applikation. Nil, Analyse unbehandelter Mäuse, PBS, Behandlung mit 50µl PBS/Applikation am Tag 1,3 und 6, SEB, intranasale Administration der angegebenen Menge SEB/Applikation am Tag 1,3 und 6. Dargestellt sind die Mittelwerte von 5-8 Tieren  $\pm$  SD aus drei unabhängigen Experimenten (A) Lymphozyten. (B) Eosinophile. (C) Neutrophile. (D) Makrophagen.

### Dosisabhängige peribronchiale Inflammation

Zur Dokumentation der lokalen SEB Wirkung und zum Verifizieren der BAL Daten wurde aus jeder Behandlungsgruppe eine Lunge entnommen und histologisch untersucht. Paraffinschnitte wurden nach Giemsa gefärbt und bei 200facher Vergrößerung aufgenommen (Abb. 10). Nasale Applikation von PBS und SEB bis zu einer Menge von 5ng hatte keinen lokalen irritativen oder entzündlichen Effekt, erkennbar an der normalen Atemwegsmorphologie. Wie in der BAL konnte auch in der Histologie die geringste Menge an SEB, die ein peribronchiales Entzündungsinfiltrat induzierte auf 50 ng/Applikation bestimmt werden. Dieses Infiltrat besteht zum Großteil aus eosinophilen Granulozyten (vgl. Abb. 9). Steigerung auf 500ng führte zu einer massiven Inflammation, die durch neutrophile Granulozyten gekennzeichnet ist.



10: Histologie der SEB - Titration

Abb.



## Zytokinkonzentration in der BAL

Ein weiterer Parameter, der zur Untersuchung der SEB Wirkung analysiert wurde, ist die Konzentration der Zytokine in der BAL. Diese werden von verschiedenen Zellen in den Alveolarraum sezerniert, und lassen eine Aussage über den Aktivierungszustand und - aufgrund der divergierenden Ursprungszellen - eine Differenzierung des Infiltrates bzw. der aktivierten Zellen zu.

Nasale SEB-Applikation führt zum Anstieg der IL-4 und IL-5 Konzentration in der BAL

Ein wichtiger Indikator der T-Zell Aktivität und -Funktion ist die Produktion von Zytokinen, wobei den Th2 Zytokinen IL-4 und IL-5 bei der allergischen Inflammation eine zentrale Rolle zukommt.

Nach SEB Applikation konnte eine dosisabhängige Steigerung der IL-4 und IL-5 Konzentration gemessen werden (Abb. 11). IL4 (**A**) steigt dosisabhängig und erreicht bei 50ng einen Spitzenwert ( $361 \pm 64$  pg/ml;  $p \leq 0,006$ ). Die IL-5 Konzentration (**B**) erreicht wie IL-4 bei 50ng einen Peak ( $136 \pm 37$ pg/ml;  $p \leq 0,006$ ), um bei 500ng ebenso wie IL-4 auf den Wert der Kontrolle zurückzufallen. Die Konzentration von 50ng SEB/Appl konnte - wie auch bei der Zelldifferenzierung - als optimaler minimaler Stimulus für die Inflammation bestimmt werden. Die für die allergische Inflammation bedeutenden Zytokine IL-4 („Pro - Allergisch“ durch IgE Induktion) und IL-5 (bedeutender chemotaktischer und stimulierender Faktor für Eosinophile Granulozyten) sind bei dieser Konzentration signifikant erhöht. Dieser Anstieg zeigt, wie die Differenzierung der zellulären Komponente, einen bisher nicht beschriebenen Effekt des Superantigens in der Induktion einer Inflammation vom „Allergischen Typ“, bei der *in vivo* IL-4, IL-5 und die Zahl der Eosinophilen Granulozyten erhöht sind.

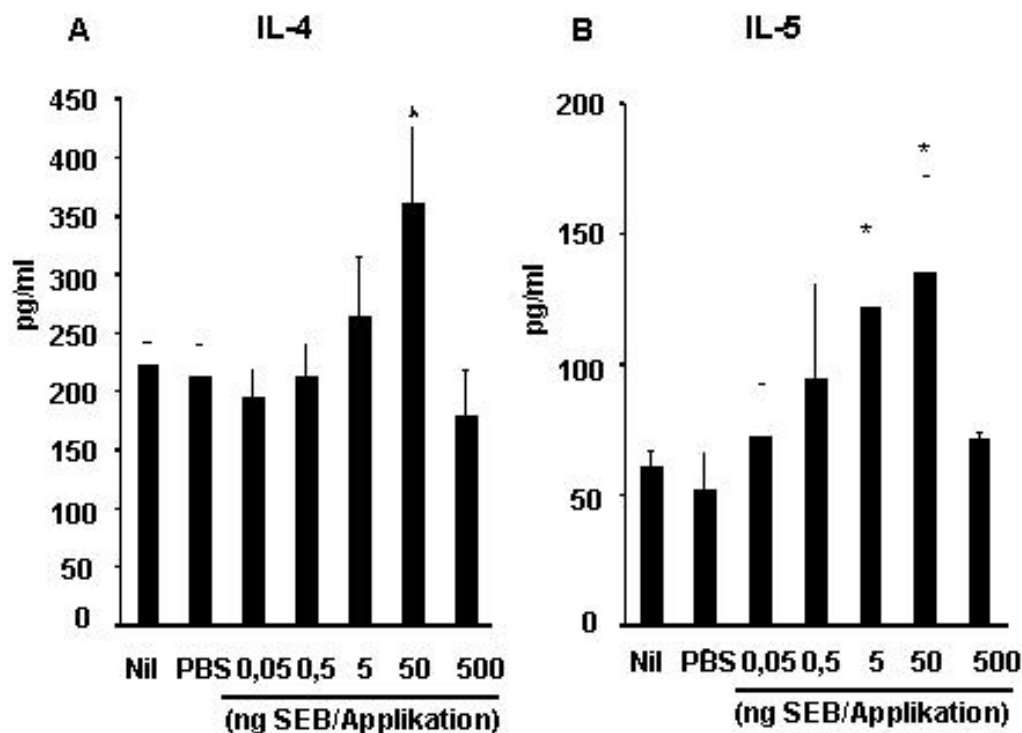


Abb. 11:

Konzentration der Th2 T - Zell Zytokine IL4 (**A**) und IL5 (**B**) in der BAL nach SEB Behandlung. Die Zytokinkonzentration aus der BAL Flüssigkeit wurde mit ELISA wie beschrieben gemessen. Die Lavage

wurde nach dreimaliger nasaler Applikation der angegebenen SEB Mengen durchgeführt. Die Kontrollen wurden nach PBS Applikation b.z.w. unbehandelt (Nil) analysiert. Dargestellt ist der Mittelwert  $\pm$  SD von fünf Mäusen je Gruppe aus unabhängigen Experimenten, die statistische Signifikanz zwischen Kontrollen (PBS) und behandelten Tieren (SEB) wurde mit Student t Test bestimmt ( $p \leq 0,006$ ; \*).

### **Dosisabhängiger Anstieg der TNF- $\alpha$ Konzentration in der BAL nach SEB Applikation**

TNF- $\alpha$  ist ein proinflammatorisches Zytokin, daß hauptsächlich von aktivierten Makrophagen produziert wird und eine große Rolle bei der allergischen Inflammation und der Entwicklung bronchialer Hyperreagibilität spielt. Nach der Behandlung mit PBS in der Kontrollgruppe wurde kein Unterschied zu völlig unbehandelten Tieren festgestellt. Die SEB Applikation führte dosisabhängig zu einem Anstieg der Konzentration, die bei SEB - Applikation signifikant anstieg ( $841 \pm 132$ pg/ml bei 50 ng/Appl  $p \leq 0,04$ ). Allerdings zeigt TNF- $\alpha$  bereits nach Applikation von 5ng/Appl einen signifikanten Anstieg, eine Menge, die zwar keine sichtbare Entzündung in der Lunge induziert aber auch hinreichend für eine signifikante IL-5 Produktion ist (Abb. 11).

Tab. 1: TNF- $\alpha$  Konzentration in der BAL, Die Tiere wurden unbehandelt (Nil) oder nach dreimaliger Applikation von SEB in den angegebenen Konzentrationen analysiert. Signifikanzen wurden mit dem Student t Test bestimmt ( $p \leq 0,05$ ; \*;  $n = 5$ /Gruppe)

<b>Behandlung</b>	<b>pg/ml</b>
Nil	423 $\pm$ 177
PBS	312 $\pm$ 106
0,05ng	597 $\pm$ 72
0,5ng	593 $\pm$ 165
5ng	667 $\pm$ 47*
50ng	841 $\pm$ 132*
500ng	884 $\pm$ 242*

### **Nasal appliziertes SEB induziert bronchiale Hyperreagibilität**

Die Messung der AR *in vitro* durch elektrische Stimulation in einem Wechselstromfeld repräsentiert die nervale Erregbarkeit der Bronchialmuskulatur. Abfall der Stimulationsfrequenz, die die halbmaximale Kontraktion der Trachea bewirkt, ist ein Indikator für gesteigerte Erregbarkeit oder Abfall der Erregungsschwelle der Muskulatur. Dreimalige nasale Applikation von SEB induziert schon bei der geringsten eingesetzten Menge (5ng/Applikation) bronchiale Hyperreagibilität (Abfall der ES 50 von  $4,0 \pm 0,5$  Hz auf  $2,75 \pm 0,5$  Hz;  $p \leq 0,003$ ), die Applikation der 100 fachen Menge (500ng/Applikation) hingegen



führt zu keinem weiteren Anstieg (ES 50  $2,5 \pm 0,6$ )

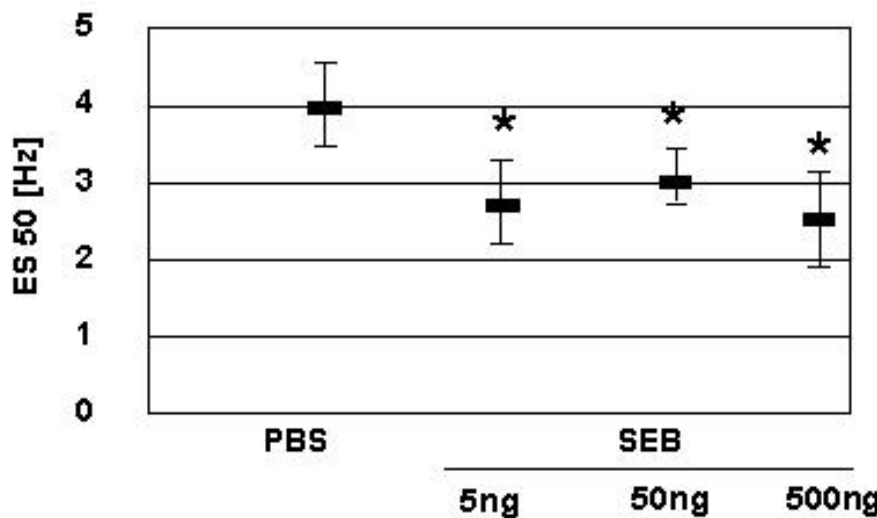


Abb. 12:

Messung der AR in C57BL/6 Mäusen nach dreimaliger Applikation der angegebenen Menge SEB, Kontrollen erhielten nur PBS. Die AR wurden 24 h nach der letzten Applikation an einem Trachealsegment durch elektrische Stimulation bestimmt. Abgebildet sind die Mittelwerte  $\pm$  SD der Frequenz, die zu 50% der maximalen Kontraktion führte. Es wurden 2 unabhängige Experimente durchgeführt, pro Gruppe wurden 5-7 Mäuse analysiert. Statistische Signifikanz ( $p \leq 0.007$ ) ist durch (\*) gekennzeichnet.

Diese Daten zeigen, daß SEB Zytokinproduktion und BHR induzieren kann, die für allergenunabhängiges, intrinsisches AB typische sind.

### Einfluß von SEB auf OVA sensibilisierte C57BL/6 Mäuse.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit bestand in der Untersuchung von SEB als Triggerfaktor der *allergischen* Inflammation in einem Mausmodell des extrinsischen AB. Die Sensibilisierung erfolgte durch wiederholte intraperitoneale Injektion von Ovalbumin in Verbindung mit  $Al(OH)_3$  als Adjuvans. Das Allergen wird vor allem durch die Peritonealmakrophagen prozessiert und induziert die Immunglobulinproduktion in B Zellen. Diese sensibilisierten Tiere werden vor der Analyse einer Allergenchallenge unterzogen, d.h. die Mäuse werden 10 min einer aerosolisierten OVA Lösung ausgesetzt die eingeatmet wird und durch Vernetzung von IgE auf Mastzellen eine allergische Soforttypreaktion in der Lunge induziert. Um den Effekt von bakteriellem Superantigen auf die lokale allergische Inflammation in der Lunge zu untersuchen wurde 50ng SEB/Appl nach der Sensibilisierung, vor der Allergenchallenge, nasal appliziert. Diese Konzentration wurde im ersten Teil dieser Arbeit durch Titration als niedrigste proinflammatorische bestimmt, die zu einem Anstieg von IL-4, IL-5, Eosinophilen und Lymphozyten führte.

## Anstieg der Immunglobulintiter nach OVA - Sensibilisierung

Sensibilisierung der Tiere führt zu einer Produktion von Immunglobulinen, die im Serum nachgewiesen werden können.

Die Gesamt- IgE und OVA spezifische IgE/IgG1/IgG2a Titer zeigen in der SEB behandelten Gruppe keinen Anstieg im Vergleich zu den PBS behandelten Kontrollen, womit ein unspezifischer Einfluß des SA auf die Immunglobulinsynthese ausgeschlossen werden kann. Nach dreimaliger intraperitonealer Sensibilisierung mit OVA steigen Gesamt IgE und die OVA spezifischen Immunglobuline an (Tab. 2). Die additive lokale Behandlung der sensibilisierten Tiere mit SEB hat keinen signifikanten Einfluß auf die Immunglobulinproduktion verglichen mit den Tieren, die keine SEB Behandlung erhielten.

Tab. 2: Total IgE- und allergenspezifische Antikörpertiter im Serum von C57BL/6 Mäusen aus den folgenden Studiengruppen: **PBS**, nasale Applikation von PBS, **OVA**, intraperitoneale Sensibilisierung mit 10µg OVA, **SEB**, nasale Applikation von 50ng SEB/Applikation, **OVA+SEB**, nasale Applikation von SEB nach erfolgter Sensibilisierung. Die Immunglobuline wurden im ELISA wie im Methodenteil beschrieben aus Serumproben bestimmt, die am Tag 22 nach der ersten Sensibilisierung, entnommen wurden. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD aus unabhängigen Experimenten mit 6-14 Mäusen/Gruppe, Signifikanzen wurden mit Student t Test bestimmt ( $p \leq 0,05$ ; \*).

C57BL/6	Behandlung		Serumantikörper			
	i.p.	i.n.	Total IgE [ng/ml]	anti-OVA IgE [EU/ml]	anti-OVA IgG1 [EU/ml]	anti-OVA IgG2a [EU/ml]
-	PBS		59 $\pm$ 10	$\leq 20$	$\leq 10$	101 $\pm$ 2
OVA	PBS		277 $\pm$ 153*	210 $\pm$ 140*	254 $\pm$ 161*	1152 $\pm$ 1017*
-	SEB		61 $\pm$ 28	$\leq 20$	$\leq 10$	$\leq 100$
OVA	SEB		190 $\pm$ 151*	189 $\pm$ 160*	360 $\pm$ 173*	1793 $\pm$ 1298*

## Histologischer Nachweis der Inflammation in der Lunge von C57BL/6

Das histologische Bild des inflammatorischen peribronchialen Infiltrats gewährleistet eine sichere Beurteilung der pathologischen Veränderungen der Lunge, und erlaubt Aussagen über den Grad und die zelluläre Zusammensetzung der Inflammation. Die nasale Behandlung mit PBS induziert kein zelluläres Infiltrat (Abb. 13). OVA Sensibilisierung mit lokaler Allergenchallenge führt zu einer leichten Inflammation mit vereinzelt peribronchialen eosinophilen Granulozyten. Dieses moderate allergische Infiltrat

entspricht nicht dem histologischen Bild der schweren Inflammation beim AB im Menschen, was zu der Hypothese führte, daß additive Triggerfaktoren eine Rolle spielen. Die lokale proinflammatorische Wirkung des bakteriellen Superantigens SEB induziert in der eingesetzten minimalen Konzentration ein geringes peribronchiales Infiltrat, wobei neutrophile Granulozyten und mononukleäre Zellen überwiegen. Zu einer massiven Inflammation mit Eosinophilen und Lymphozyten, entsprechend des Infiltrats bei AB im Menschen führt nur die Kombination der allergischen Komponente nach OVA Sensibilisierung mit folgender lokaler SEB Behandlung. Das histologische Bild zeigt in C57BL/6 einen potenzierenden Effekt des Superantigens, der die einzelnen Komponenten weit übertrifft. Damit konnte gezeigt werden, daß SEB in einer minimalen Menge, die allein gerade noch einen Effekt auf die Inflammation zeigt (50ng/Appl) als Triggerfaktor einer bestehenden allergischen Inflammation wirkt.

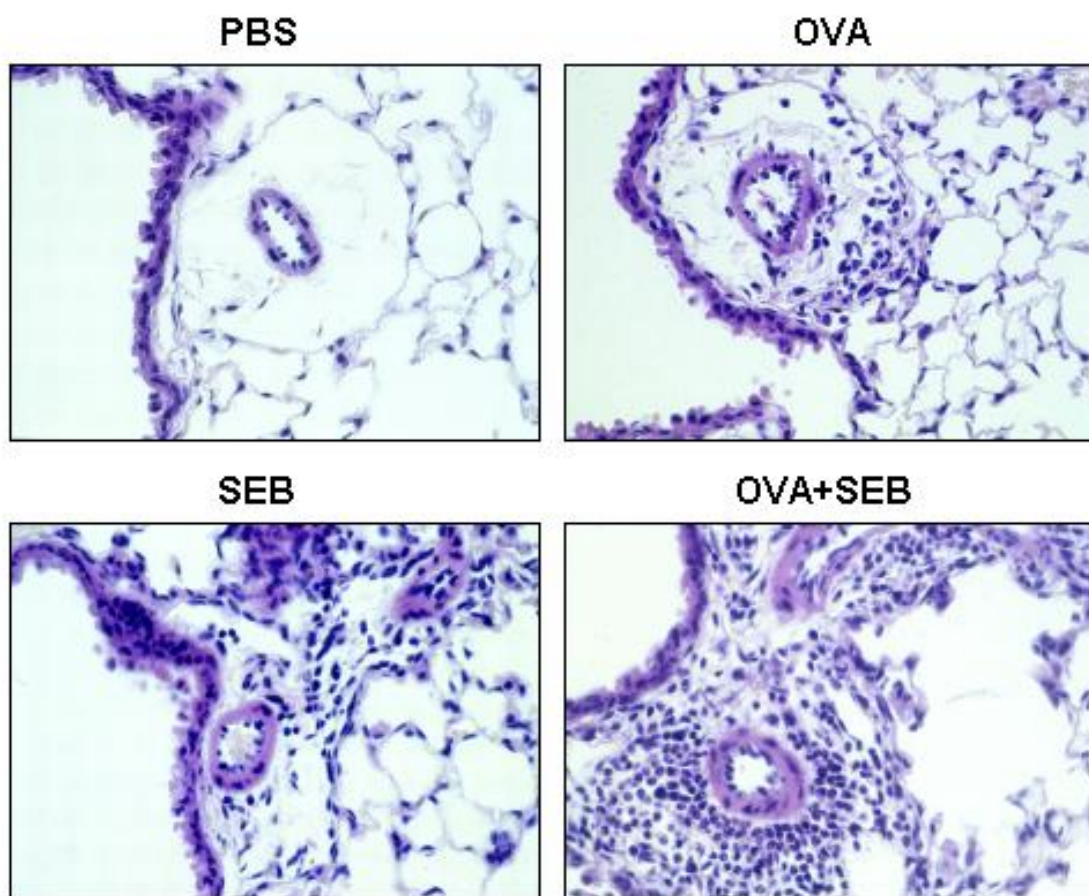


Abb. 13:

Histologie der Lunge von immunisierten und SEB behandelten Mäusen. Die Behandlung erfolgt mit OVA und/oder SEB wie angegeben. Alle Tiere wurden am Tag vor der Analyse einer Allergenchallenge unterzogen. Die Lungen wurden in Formalin fixiert, in Paraffin eingebettet, und mit HE gefärbt. (400fache Vergrößerung).

### Zunahme der Absolutzellzahl in der BAL

Die Zellzahl in der BAL kann als Indikator für den Grad der Inflammation betrachtet werden. Nasale Applikation von PBS führt, wie die intraperitoneale Sensibilisierung gegen OVA mit nasaler PBS Challenge, nicht zu signifikantem Anstieg der Zellzahl. Die nasale SEB - Behandlung induziert eine Inflammation in der Lunge, mit Anstieg der Zellzahl in der BAL. Die kombinierte Sensibilisierung mit nachfolgender i.n. SEB Applikation führt zu einem massiven Anstieg der Zellzahl, was auf einen synergistischen Effekt der lokalen Superantigenapplikation mit anschließender Allergenchallenge deutet.

Tab. 3: Gesamtzellzahl in der BAL von C57BL/6 Wt und CD23<sup>-/-</sup> Mäusen nach Sensibilisierung mit OVA. Die i.p. Injektionen von OVA mit Adjuvans erfolgten am Tag 1, 7 und 14. Die i.n. Applikation von SEB wurde nach der Sensibilisierung am Tag 15, 17 und 20 durchgeführt. Am Tag 21 erfolgte die Allergenchallenge mit aerosolisierte OVA Lösung. Die BAL wurde am Tag 22 durchgeführt.

Behandlung		Zellen/BAL [ $\times 10^3$ ]/Maus
i.p.	i.n.	
-	-	100 $\pm$ 21
-	<b>PBS</b>	137 $\pm$ 22
<b>OVA</b>	<b>PBS</b>	164 $\pm$ 34
-	<b>SEB</b>	375 $\pm$ 91*
<b>OVA</b>	<b>SEB</b>	626 $\pm$ 216*

### Anstieg der Eosinophilen und Lymphozyten in der BAL

Eine Zelldifferenzierung der BAL (Abb. 14) zeigt einen potenzierenden Effekt auf die allergische Inflammation durch SEB Behandlung. Die Sensibilisierung gegen OVA mit Allergenchallenge führte zu einer leichten bronchialen Inflammation, es ist kein Anstieg der Lymphozyten und Neutrophilen zu verzeichnen, einzig der geringe Anstieg von Eosinophilen verglichen mit der Kontrollgruppe zeigt eine moderate allergische Inflammation nach Allergenchallenge. Alleinige nasale Behandlung mit SEB führt - verglichen mit der OVA Sensibilisierung plus Challenge - zu einer stärkeren Inflammation mit signifikantem Anstieg von Lymphozyten und Eosinophilen. Nach erfolgter Sensibilisierung und dreimaliger SEB Behandlung konnte ein signifikanter Anstieg der Eosinophilen und Lymphozyten festgestellt werden, der einen synergistischen Effekt des Superantigens auf die durch das Allergen induzierte allergische Inflammation zeigt. Die Zahl der Makrophagen stieg nach Behandlung mit PBS oder SEB in keiner Gruppe signifikant an.

Das zelluläre Infiltrat insbesondere von Eosinophilen und Lymphozyten zeigt sich auch in der Histologie der Lunge, wo sich der synergistische Effekt des Superantigens auf den Grad der Inflammation verifizieren lässt.

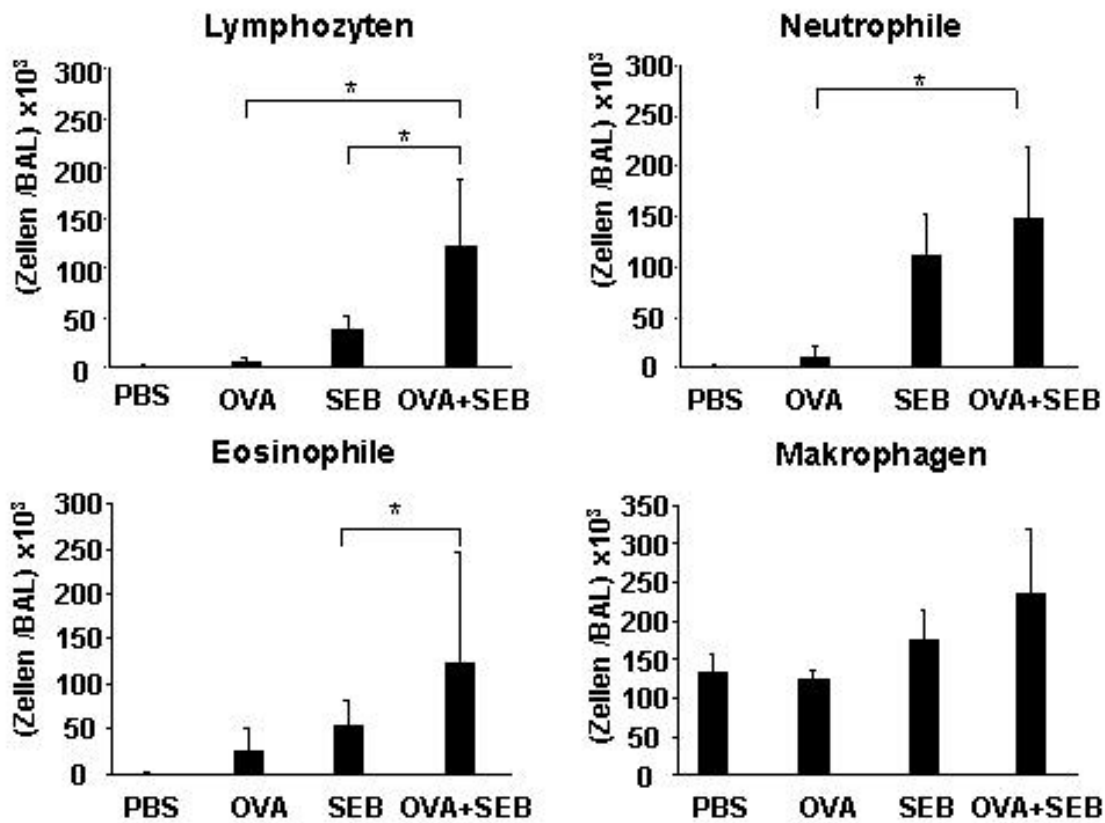


Abb. 14:

Zelldifferenzierung in der BAL für C57BL/6 aus den angegebenen Behandlungsgruppen. Signifikanzen wurden mit Student t Test bestimmt ( $p \leq 0,05$ ; \* ).

### Zytokinkonzentration in der BAL von C57BL/6 Wt Mäusen

Die IL-4 Konzentration in der BAL steigt nach OVA Sensibilisierung und nach Sensibilisierung plus SEB Behandlung signifikant an, verglichen mit der PBS behandelten, unsensibilisierten Kontrollgruppe. In OVA sensibilisierten Tieren ist eine Erhöhung der IL-5 Konzentration ebenso wie nach alleiniger SEB Behandlung und der kombinierten OVA+SEB Applikation zu verzeichnen. IFN- $\gamma$  zeigt keine Veränderungen in allen Behandlungsgruppen. Dieses Ergebnis entspricht eher einem Th2 Phänotyp, das Th1 Zytokin IFN- $\gamma$  wird auch durch SEB nicht induziert.

Tab. 4: Die Zytokinkonzentration in der BAL wurde in C57BL/6 Mäusen mit ELISA gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD von einem repräsentativen Experiment (n=5) aus 2 - 4 unabhängigen Experimenten. Signifikanzen ( \*  $p \leq 0,05$  zur PBS Kontrolle) wurden mit dem Student t Test bestimmt.

C57BL/6	Behandlung		Zytokinkonzentration [pg/ml]		
	i.p.	i.n.	IL-4	IL-5	IFN- $\gamma$
	-	PBS	156 $\pm$ 26	12 $\pm$ 2	208 $\pm$ 58
	OVA	PBS	624 $\pm$ 108*	101 $\pm$ 67*	280 $\pm$ 67
	-	SEB	196 $\pm$ 24	72 $\pm$ 20*	183 $\pm$ 27
	OVA	SEB	376 $\pm$ 131*	50 $\pm$ 40*	273 $\pm$ 132

### Bronchiale Hyperreagibilität nach OVA Sensibilisierung und SEB Applikation

Die Messung der BHR ist eine anerkannte und etablierte Methode um die allergische Typ 1 Reaktion in der Lunge zu quantifizieren. Nach Allergenprovokation mit aerosolisiertem Allergen, die als unbedingte Voraussetzung für die Ausbildung der BHR gezeigt wurde ([Renz et al, 1992](#)), kommt es in sensibilisierten Tieren zur Vernetzung von IgE/IgG1 AK auf Mastzellen. Die dadurch induzierte Sezernation von lokalen Entzündungsmediatoren wie TNF- $\alpha$  und Arachidonsäuremetaboliten (Prostaglandine) sowie Histamin führt zu einer gesteigerten Erregbarkeit der glatten Atemwegsmuskulatur.

In C57BL/6 Wt Mäusen führt die i.n. Applikation von PBS nicht zu einem Anstieg der Reaktivität der Trachea. Sensibilisierung der Mäuse gegen OVA mit folgender Allergenchallenge führt zu einem signifikanten Anstieg der Reagibilität (ES50: 3,1  $\pm$  0,6;  $p \leq 0,05$ ) verglichen mit der Kontrolle (ES 50: 4,1  $\pm$  0,6). Die nasale SEB Applikation ohne Allergen führt wie die Sensibilisierung zu einem signifikantem Anstieg der ES 50 (3,1  $\pm$  0,4;  $p \leq 0,05$ ) wodurch ein Allergen- und Immunglobulin - unabhängiger Mechanismus für die Ausbildung bronchialer Hyperreagibilität gezeigt werden konnte. Der höchste Anstieg erfolgt nach SEB Applikation in sensibilisierten Tieren (ES 50: 2,1  $\pm$  0,5;  $p \leq 0,05$ ) was einen synergistischen Effekt des SA auf die BHR, und damit die Addition der Effekte des IgE - abhängigen wie des allergenunabhängigen Mechanismus zeigt. Diese Ergebnisse zeigen eine bisher nicht beobachtete Funktion des bakteriellen Superantigens bei der Induktion von BHR.

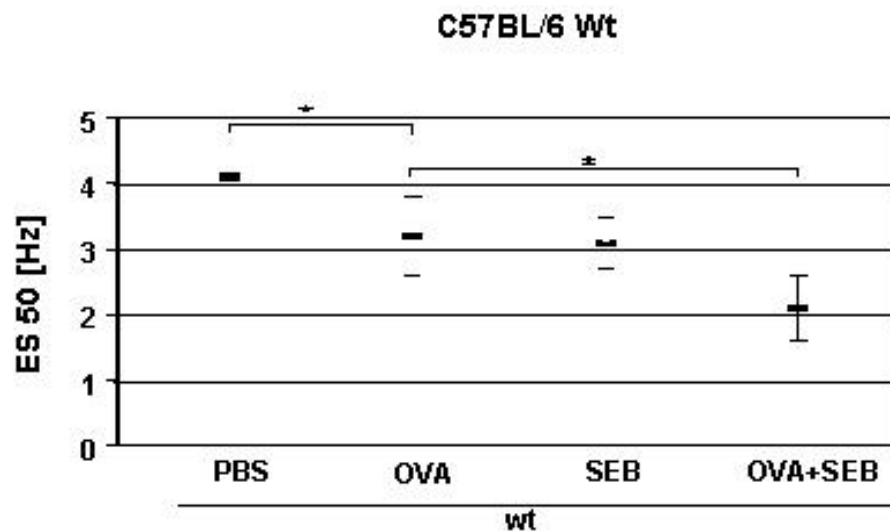


Abb. 15:

Messung der AR in C57BL/6 Mäusen in folgenden Studiengruppen: **PBS**, **OVA**, **SEB** und **OVA+SEB**. Alle Tiere wurden 24h und 12h vor der Analyse einer Allergenchallenge mit aerosolisiertem OVA unterzogen. Die AR wurde am folgenden Tag an einem Trachealsegment durch elektrische Stimulation bestimmt. Abgebildet sind der Mittelwert  $\pm$  SD der Frequenz, die zu 50% der maximalen Kontraktion führte. In 3 unabhängige Experimente wurden pro Gruppe 5-7 Mäuse analysiert. Statistische Signifikanz ( $p \leq 0.05$ ) ist durch (\*) gekennzeichnet.

### Einfluß des CD23 Rezeptors

Für den Low affinity IgE Rezeptor CD23 konnte in der Maus und im Menschen eine wichtige - wenn auch kontrovers bewertete - Funktion in der Regulation der IgE Synthese gezeigt werden. Um den direkten Einfluß des Low Affinity IgE Rezeptors (CD23) auf die allergische Inflammation in diesem Tiermodell zu untersuchen wurden alle Experimente parallel zu normalen C57BL/6 Mäusen (Wildtype: Wt) auch in CD23 Knock-Out (CD23<sup>-/-</sup>) Mäusen durchgeführt. Diese gentechnisch generierten Tiere entsprechen dem C57BL/6 Phenotyp mit Ausnahme des deletierten CD23 Rezeptors, womit sich alle beobachteten Differenzen ausschließlich auf das Fehlen dieses Rezeptors zurückführen lassen.

### Einfluß des CD23 Rezeptors auf die allergische Sensibilisierung

CD23<sup>-/-</sup> Mäuse zeigen einen Anstieg der Gesamt - IgE Konzentrationen nach OVA Sensibilisierung, wenn auch geringer als C57BL/6 Wt ( $277 \pm 153\text{ng/ml}$  gegenüber  $69 \pm 15\text{ng/ml}$ ). Allergenspezifische IgE und IgG1 Titer stiegen nach OVA Injektion Signifikant an, was auf eine profunde Sensibilisierung der Tiere schließen läßt. Die additive lokale Behandlung der sensibilisierten Tiere mit SEB hat keinen signifikanten Einfluß auf die IgE und IgG1 Produktion verglichen mit den Tieren, die keine SEB Behandlung erhielten. Auch zwischen den C57BL/6 Wt und CD23<sup>-/-</sup> Tieren bestehen bis auf einen signifikanten Abfall der IgG2a Titer nach SA Applikation in Knock-Out Tieren keine Unterschiede.

Tab. 5: Total IgE- und allergenspezifische Antikörpertiter im Serum von C57BL/6 CD23 <sup>-/-</sup> Mäusen aus den folgenden Studiengruppen: **PBS**, nasale Applikation von PBS, **OVA**, intraperitoneale Sensibilisierung mit 10µg OVA, **SEB**, nasale Applikation von 50ng SEB/Applikation, **OVA+SEB**, nasale Applikation von SEB nach erfolgter Sensibilisierung. Die Immunglobuline wurden im ELISA wie im Methodenteil beschrieben aus Serumproben bestimmt, die am Tag 22 nach der ersten Sensibilisierung, entnommen wurden. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SD aus unabhängigen Experimenten mit 6-14 Mäusen/Gruppe, Signifikanzen wurden mit Student t Test bestimmt ( $p \leq 0,05$ ; \*).

CD23 <sup>-/-</sup>	Behandlung		Serumantikörper			
	i.p.	i.n.	Total IgE [ng/ml]	anti-OVA IgE [EU/ml]	anti-OVA IgG1 [EU/ml]	anti-OVA IgG2a [EU/ml]
-	PBS		53 ± 6	≤ 20	≤ 10	≤ 100
OVA	PBS		69 ± 15	76 ± 71*	251 ± 188*	1784 ± 1455*
-	SEB		≤ 50	≤ 20	≤ 10	≤ 100
OVA	SEB		165 ± 127*	46 ± 41*	225 ± 168*	141 ± 45*

### CD23 <sup>-/-</sup> ist ein entscheidender Faktor für pulmonale Inflammation

Die CD23 <sup>-/-</sup> Mäuse wurden wie die Wt Tiere i.p. mit OVA sensibilisiert und nasal mit SEB behandelt. Nach zweimaliger OVA Aerosol Challenge wurden die Lungen entnommen und histologisch untersucht. In C57BL/6 Wt induzierte die Sensibilisierung nach Allergenchallenge eine allergische Inflammation, charakterisiert durch eosinophile Granulozyten, additive SEB Behandlung führte zu einem starken Anstieg des entzündlichen Infiltrates mit massiver Eosinophilie.

Die allergische Sensibilisierung mit OVA alleine sowie mit folgender SEB Behandlung in CD23<sup>-/-</sup> Tieren zeigt ein fast völliges Fehlen einer peribronchialen Entzündung im Vergleich zu den C57BL/6 Tieren (Abb. 16).



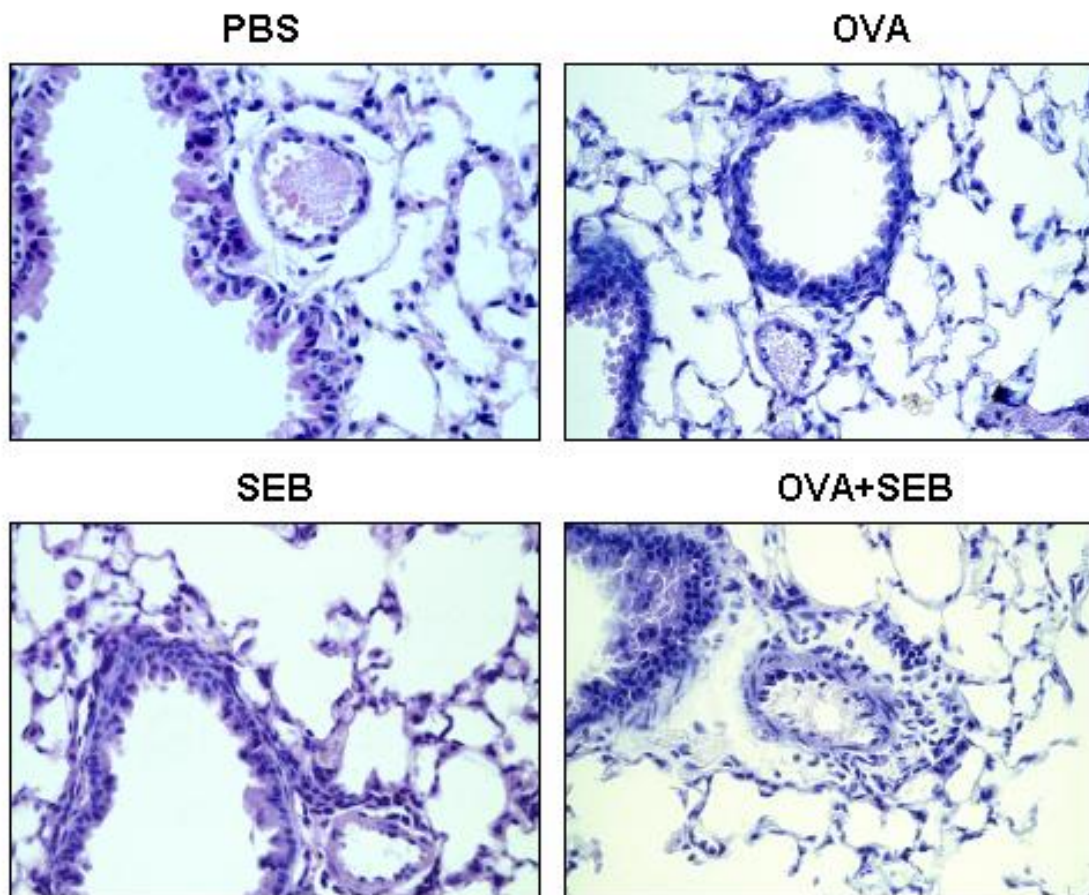


Abb. 16:

Histologie der Lunge von immunisierten und SEB behandelten CD23 <sup>-/-</sup> Mäusen. Die Behandlung erfolgt mit OVA und/oder SEB wie angegeben. Alle Tiere wurden am Tag vor der Analyse zwei mal mit aerosolisiertem OVA behandelt. Die Lungen wurden in Formalin fixiert, in Paraffin eingebettet, und mit HE gefärbt. (400fache Vergrößerung)

### **Anstieg der Zellzahl in der BAL von CD23 <sup>-/-</sup> Mäusen**

Wt und CD23 <sup>-/-</sup> Mäusen zeigen einen Anstieg der Absolutzellzahl in der gewonnenen BAL - Fluid, wobei keine signifikanten Differenzen nach OVA Sensibilisierung im Vergleich zur Kontrollgruppe gefunden wurde, d.h. OVA Sensibilisierung plus Allergenchallenge konnte keine für AB typische Atemwegsinfammation in diesem Modell induzieren. Nur Behandlung mit SEB allein oder zusätzlich zu der OVA Sensibilisierung konnte die Zahl der Zellen im Bronchialraum signifikant erhöhen. CD23 <sup>-/-</sup> zeigten einen geringeren Anstieg als die C57BL/6 Wt in den entsprechenden Gruppen, was auch bereits in der Histologie gezeigt wurde.

Tab. 6: Gesamtzellzahl in der BAL von C57BL/6 Wt und CD23<sup>-/-</sup> Mäusen nach Sensibilisierung mit OVA. Die i.p. Injektionen von OVA erfolgten am Tag 1, 7 und 14. Die i.n. Applikation von SEB wurde nach der Sensibilisierung am Tag 15, 17 und 20 durchgeführt. Am Tag 21 erfolgte zweimalige Allergenchallenge mit aerosolisierte OVA Lösung. Die BAL wurde am Tag 22 durchgeführt. (n.d. = wurde nicht bestimmt, \* p ≤ 0,05)

Behandlung		Zellen/BAL [ $\times 10^3$ ]/Maus	
i.p.	i.n.	Wt	CD23 <sup>-/-</sup>
-	-	100 ± 21	n.d.
-	<b>PBS</b>	137 ± 22	97 ± 28
<b>OVA</b>	<b>PBS</b>	164 ± 34	139 ± 70
-	<b>SEB</b>	375 ± 91*	244 ± 46*
<b>OVA</b>	<b>SEB</b>	626 ± 216*	442 ± 160*

#### Signifikante Unterschiede der BAL - Zelldifferenzierung in C57BL/6 Wt versus CD23<sup>-/-</sup>

Der Vergleich der transgenen Tiere mit den Wildtype-Mäusen zeigt einen Einfluß des CD23 Rezeptors auf die zelluläre Komponente der Inflammation (Abb. 17). Der Anstieg der Lymphozyten und Eosinophilen entspricht dem der C56BL/6 Wt Tiere. Die Zahl der Makrophagen und Neutrophilen in der BAL nach SEB Behandlung sensibilisierter Mäuse ist signifikant kleiner verglichen mit den Wt Tieren. Der Low Affinity IgE Rezeptor beeinflusst damit auf der zellulären Ebene vor allem die unspezifischen, frühen Effektorzellen der Inflammation, der Anstieg der Zellen der allergischen Inflammation (Lymphozyten und Eosinophile) zeigt keinen direkten Einfluß des CD23 Rezeptors in der Migration dieser Zellen. Die Rolle des Low affinity IgE Rezeptors in der Aktivierung von Makrophagen bedarf damit weiterer experimenteller Abklärung, welche im Folgenden anhand der TNF- $\alpha$  Synthese erfolgt.

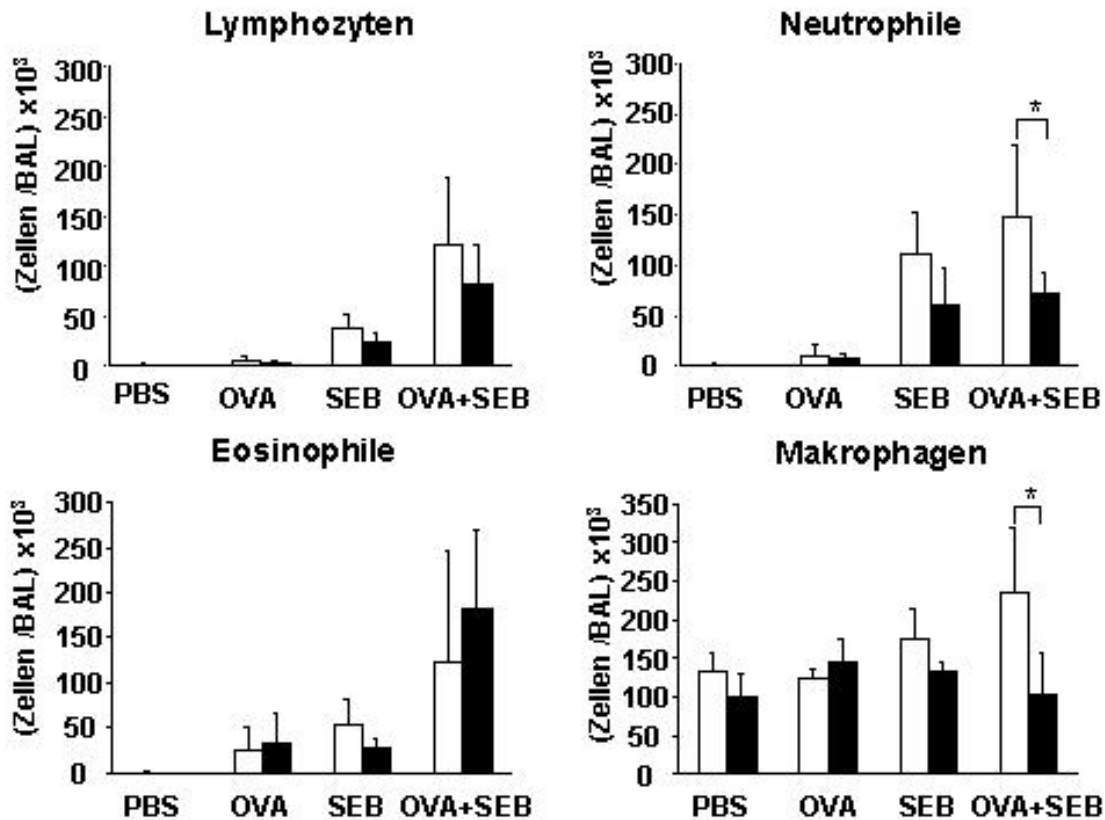


Abb. 17:

Zelldifferenzierung der BAL Fluid von C57BL/6 Wt und CD23<sup>-/-</sup> Mäusen. Die weißen Balken stellen die Wt, die schwarzen Balken die CD23<sup>-/-</sup> Tiere dar. Gezeigt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD von fünf bis sechs Tieren je Gruppe aus mehreren unabhängigen Experimenten. Signifikanzen wurden mit Student t Test bestimmt ( $p \leq 0,05$ , \*).

### Zytokinkonzentration in der BAL von CD23<sup>-/-</sup> Mäusen

Während die IL-4 und IL-5 Konzentration in der BAL von Wt nach OVA Sensibilisierung und nach Sensibilisierung plus SEB Behandlung signifikant ansteigt, konnte in den CD 23<sup>-/-</sup> Tieren nur die additive Behandlung OVA sensibilisierter Mäuse mit SEB einen Anstieg von IL-4 und IL-5 induzieren. Die alleinige OVA Sensibilisierung mit Allergenchallenge ist nicht hinreichend in den CD 23<sup>-/-</sup> ( $p \leq 0,05$  im Vergleich mit C57BL/6 Wt). IFN- $\gamma$  zeigt keine Veränderungen in den Wt Mäusen, in den CD23<sup>-/-</sup> Tieren ist seine Konzentration nach SEB Applikation ohne als auch mit Sensibilisierung signifikant im Vergleich zur PBS Kontrollgruppe erhöht.

Tab. 7: Die Zytokinkonzentration in der BAL wurde in CD23<sup>-/-</sup> Mäusen mit ELISA gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD von einem repräsentativen Experiment (n=5) aus 2 - 3 unabhängigen Experimenten. Signifikanzen ( \*  $p \leq 0,05$  zur PBS Kontrolle) wurden mit dem Student t Test bestimmt.

	Behandlung		Zytokinkonzentration [pg/ml]		
	i.p.	i.n.	IL-4	IL-5	IFN- $\gamma$
CD23 <sup>-/-</sup>	-	PBS	142 $\pm$ 50	26 $\pm$ 7	377 $\pm$ 58
	OVA	PBS	153 $\pm$ 13	37 $\pm$ 16	295 $\pm$ 71
	-	SEB	194 $\pm$ 14	42 $\pm$ 8	527 $\pm$ 56*
	OVA	SEB	307 $\pm$ 101*	70 $\pm$ 27*	506 $\pm$ 52*

#### **CD23 <sup>-/-</sup> entwickeln keine BHR**

Um den Einfluß des IgE R II (CD23) auf die Immunreaktion zu untersuchen wurden CD23 Knock Out Mäuse (CD23<sup>-/-</sup>) wie die C57BL/6 Wt Mäuse gegen OVA sensibilisiert und mit SEB behandelt. Die AR Messung in CD23<sup>-/-</sup> zeigte in allen Behandlungsgruppe keine signifikanten Unterschiede in der ES 50, der Meßgröße für die BHR, d.h in Abwesenheit des Low Affinity IgE Rezeptors gibt es (zumindest in diesem Mausmodell) keine BHR. Diese Ergebnisse implizieren einen großen Einfluß des Low Affinity IgE Rezeptors für die lokale IgE Bindung und die Induktion von BHR nach Vernetzung der Antikörper durch die Allergenprovokation. Die Induktion von IL-4 und IL-5 sowie der signifikante Influx von Eosinophilen Granulozyten und Lymphozyten in den Bronchialraum ist nicht hinreichend für die Entwicklung einer BHR. Da auch der allergenunabhängige Weg, der in den Wild Type Mäusen nach SEB Applikation - möglicherweise über TNF- $\alpha$  - eine bronchiale Hyperreagibilität induziert in den CD23<sup>-/-</sup> Tieren nicht existiert (Siehe 3.5), muß dem CD23 Rezeptor ein entscheidende Rolle in der Pathogenese der Atemwegsobstruktion bei AB beigemessen werden.

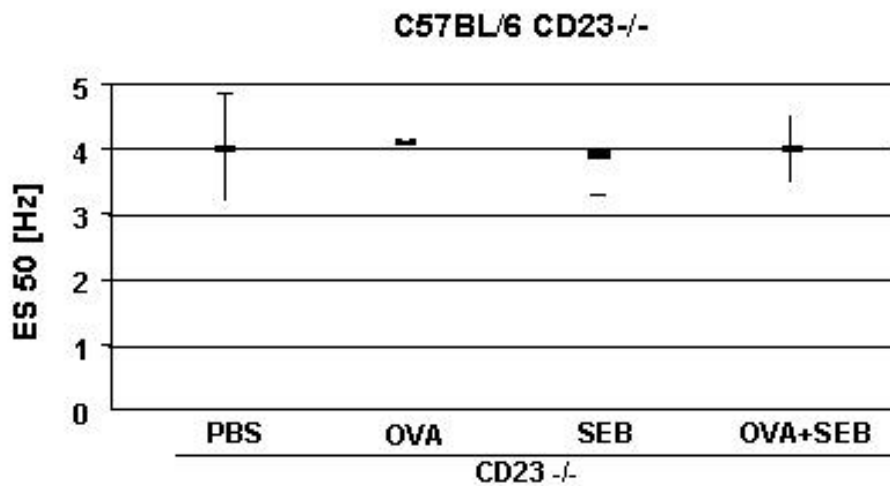


Abb. 18:

CD23<sup>-/-</sup> Mäuse zeigen keine Induktion von BHR, weder nach OVA Sensibilisierung noch nach alleiniger oder additiver SEB Behandlung. Alle Tiere wurden 24h und 12h vor der Analyse einer Allergenchallenge unterzogen. Die AR wurde am folgenden Tag an einem Trachealsegment durch elektrische Stimulation bestimmt. Abgebildet sind der Mittelwert  $\pm$  SD der Frequenz, die zu 50% der maximalen Kontraktion führte. In 3 unabhängige Experimente wurden pro Gruppe 5-7 Mäuse analysiert.

### Rolle von TNF- $\alpha$ in der Induktion von BHR

Die Konzentration von TNF- $\alpha$  in der BAL ist ein Marker für die Aktivierung von Makrophagen, da diese die Hauptquelle für dieses Zytokin darstellen. In C57BL/6 Wt Mäusen steigt die Konzentration nach OVA sowie SEB Behandlung mit Allergenchallenge signifikant an, verglichen mit der PBS Kontrollgruppe. Die Konzentration nach SEB Behandlung in sensibilisierten Tieren zeigt hingegen keinen Anstieg. In CD23<sup>-/-</sup> Mäusen ist die TNF- $\alpha$  Konzentration signifikant niedriger verglichen mit Wt Mäusen. Bemerkenswert ist, daß die Konzentration sich in keiner der Behandlungsgruppen von der in PBS behandelten CD23<sup>-/-</sup> (Kontrollgruppe) unterscheidet. Dieses Ergebnis zeigt eine Korrelation mit der Zahl der Makrophagen in der BAL aus CD23<sup>-/-</sup> Mäusen, die signifikant unter der Zahl in Wt Tieren liegt (Abb. 17). Diese Ergebnisse lassen auf einen bedeutenden Einfluß des CD23 Rezeptors für die Aktivierung von Makrophagen schließen, da die Zahl und der Aktivierungszustand der Alveolarmakrophagen bei den hier untersuchten pulmonalen Entzündungsprozessen in den CD23<sup>-/-</sup> Mäusen deutlich verringert ist. Auch in der Messung der BHR konnten in CD23<sup>-/-</sup> Mäusen keine Unterschiede in den Behandlungsgruppen eruiert werden (Abb. 18), was sich unter mit der Differenz in der TNF- $\alpha$  Konzentration korrelieren läßt.

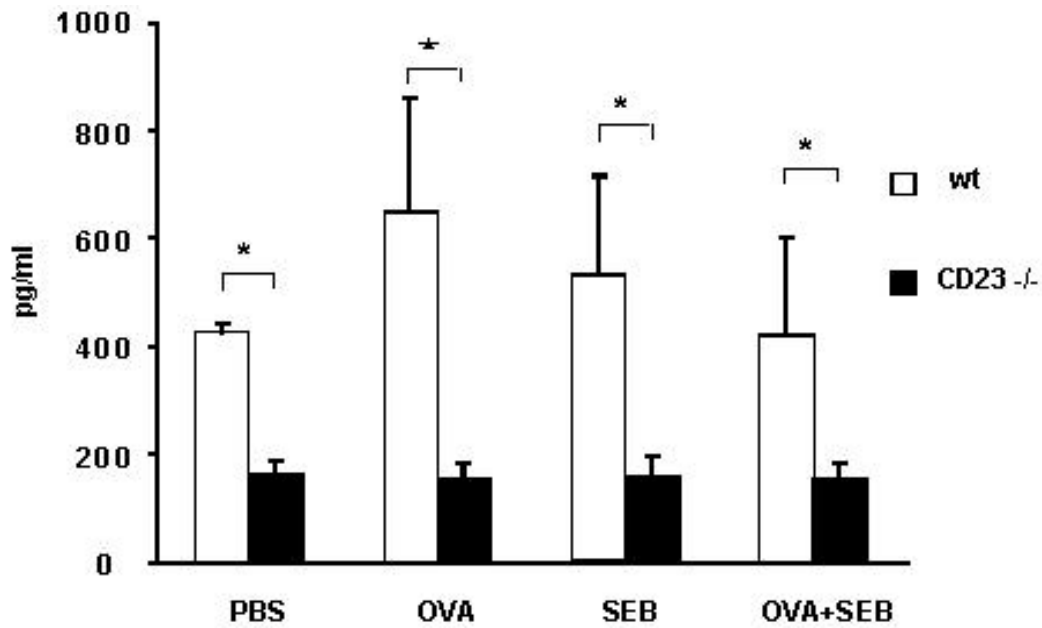


Abb. 19:

Abb. 19. TNF- $\alpha$  Konzentration in der BAL von C57BL/6 Wt und CD23<sup>-/-</sup> Mäusen. 24h und 12h vor der Analyse wurde eine Allergenchallenge durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD aus unabhängigen Experimenten mit fünf Tieren je Gruppe. Weiße Balken repräsentieren C57BL/6 Wt, schwarze Balken CD23<sup>-/-</sup> Mäuse. Statistische Signifikanzen zwischen Wt und CD23<sup>-/-</sup> Mäusen wurden mit Student t Test berechnet ( $p \leq 0,05$ ; \*).

## Zusammenfassung der Ergebnisse

1. Die nasale Applikation von Reagenzien unter Narkose führt zur Aspiration der Flüssigkeit in die Lunge. Damit wurde eine Methode etabliert, um die direkte Wirkung von Chemikalien, Zytokinen, Neurotransmittern und anderen Stoffen auf die Atemwege im Tiermodell zu untersuchen.
2. Nasale Applikation von SEB in C57BL/6 Wt führt zu einem dosisabhängigen Anstieg der Gesamtzellzahl in der BAL. Die Zelldifferenzierung zeigt einen Anstieg der Lymphozyten auf ein signifikant erhöhtes Niveau ab einer Konzentration von 50ng/Appl. Eosinophile zeigen ein Maximum bei 50ng/Appl, bei 500ng/Appl fällt ihre Zahl leicht ab während neutrophile Granulozyten einen logarithmischen Anstieg ab 50ng/Appl zeigen. Diese Inflammation konnte in der Lungenhistologie verifiziert werden. Die proallergischen Zytokine IL-4 und IL-5 zeigen einen Anstieg ebenso wie TNF- $\alpha$  bei 50ng/Appl., die damit empirisch als Schwellenkonzentration für die Induktion lokaler immunologischer Reaktionen in diesem Modell ermittelt wurde, und in den weiteren Experimenten als Trigger der allergischen Inflammation eingesetzt wurde.
3. Nasale SEB Applikation induziert schon bei der geringsten eingesetzten Konzentration von 5ng/Appl in unsensibilisierten C57BL/6 Tieren BHR. Damit konnte ein allergenunabhängiger Mechanismus als Modell für intrinsisches AB etabliert werden, da BHR und peribronchiale Entzündung alleine durch die proinflammatorische Wirkung des SEB getriggert werden. Die nasale Applikation von SEB induziert keine humorale Immunantwort d. h. es wurde kein Anstieg von Antikörpern im Serum nachgewiesen.
4. Intraperitoneale Sensibilisierung mit OVA führt zum Anstieg allergenspezifischer IgE, IgG1 und IgG2a Titer im Serum von C57BL/6 Wt Tieren. Nach Allergenchallenge kommt es in C57BL/6 Wt zum Anstieg der Gesamtzellzahl und der Eosinophilen Granulozyten in der BAL, Nasale SEB Applikation in sensibilisierten Tieren induziert histologisch eine peribronchiale Inflammation mit deutlich eosinophiler- und lymphozytärer Komponente. Weiterhin kann nach kombinierter Applikation von OVA+SEB ein Anstieg der Th2 Zytokine IL-4 und IL-5 in der BAL verzeichnet werden. Signifikante BHR wird durch SEB in unsensibilisierten Tieren induziert, SEB Behandlung OVA-Sensibilisierter Mäuse kann die BHR nochmals signifikant steigern.
5. Intraperitoneale Sensibilisierung mit OVA führt in CD23-/- Tieren zum Anstieg allergenspezifischer IgE, IgG1 und IgG2a Titer im Serum, vergleichbar mit C57BL/6 Wt. Pulmonale Allergenchallenge führt in OVA-Sensibilisierten CD23 -/- Tieren zu einer geringeren peribronchialen Inflammation, Makrophagen und Neutrophile Granulozyten zeigen im Vergleich

zu Wt Tieren einen signifikant niedrigeren Anstieg.

Nach OVA Sensibilisierung kann ein Anstieg der IL-4 und IL-5 Produktion in der Lunge nur nach additiver SEB Behandlung beobachtet werden während IFN- $\gamma$  generell nach SEB Applikation erhöht ist. In CD23-/- Tieren kann in keiner Behandlungsgruppe ein Anstieg der BHR nachgewiesen werden, was auf eine zentrale Rolle des Low affinity IgE Rezeptors für die Induktion der BHR hinweist.

6. Die TNF- $\alpha$  Konzentration in der BAL zeigte einen bedeutenden Unterschied zwischen CD23-/- und Wt Tieren. Nach OVA Sensibilisierung war die Konzentration in Wt Mäusen erhöht. In CD23-/- Tieren wurde eine signifikant niedrigere TNF- $\alpha$  Konzentration gemessen, die in allen Behandlungsgruppen keinen Anstieg über den Wert der PBS Kontrollen zeigte.



# DISKUSSION

Superantigene sind Proteine, die von verschiedenen Bakterien produziert bzw. von Viren kodiert werden. Ihre Fähigkeit zur direkten unspezifischen Bindung an MHC Klasse II Moleküle und den TCR ohne vorherige Prozessierung bedingt die Aktivierung eines großen Anteils der Gesamt - T-Zell Population. Diese immunologische Besonderheit prädestiniert SA als äußerst potente Pathogene, die bei verschiedenen Erkrankungen eine Rolle spielen. Bisherige Erkenntnisse zeigen eine Rolle für SA beim Septischen Schock Syndrom ([Miethke et al, 1992](#)), Rheumatoider Arthritis ([Paliard et al, 1991](#)), Psoriasis ([Leung et al, 1993](#)), Kawasaki Syndrom ([Leung et al, 1992](#)) und Atopischer Dermatitis ([Lester et al, 1995](#)). Bei der Atopischer Dermatitis (AD) wirkt *S. aureus*, der aus Hautläsionen isoliert werden kann ([Leyden et al, 1974](#)), als zusätzlicher Triggerfaktor der Inflammation. Im Serum von AD Patienten konnten Antikörper gegen bakterielle Enterotoxine nachgewiesen werden ([Leung et al, 1993](#)). *In Vitro* Experimente konnten eine Hochregulation des CLA Antigens durch SA zeigen ([Leung et al, 1995](#)), ein Rezeptor, der eine Rolle beim Homing von T Zellen in die Haut spielt. Da auch die Nase als potentielles Reservoir für *S. aureus* eine Rolle spielt ([Ayliffe et al, 1986](#)) wurde die Rolle von nasal appliziertem Superantigen auf die allergische Inflammation in der Lunge in einem Mausmodell untersucht. Alleinige Behandlung mit SEB zeigte eine Entzündung, die dem intrinsischen, nicht-allergischen AB beim Menschen ähnelt, während die SEB Applikation in sensibilisierten Mäusen Inflammation und klinische Parameter vergleichbar zum humanen, extrinsischen AB induzieren konnte.

## SEB induziert lokale Inflammation und BHR: Modell für intrinsisches AB

Im Menschen konnte *S. aureus* im Nasalraum nachgewiesen werden, was einen Einfluß von Superantigen auf die Atemwege und das Bronchialepithel nahelegt. Für dieses hier angewandte Mausmodell konnte die nasale Applikation von Reagenzien als sichere und reproduzierbare Methode etabliert werden, um den Einfluß von verschiedenen Stoffen auf die Atemwege und das Bronchialepithel zu untersuchen.

Die immunologischen Konsequenzen lokaler SA Applikation wurden durch eine Titration der SEB Konzentration untersucht, da keine Daten zur Wirkung von SEB auf die Lunge *in vivo* vorlagen. Die Superantigenwirkung wird durch MHC Klasse II positive Zellen v.a. Makrophagen, Dendritische Zellen und das Bronchialepithel (APC) vermittelt, die T Zellen via den TCR aktivieren. Diese Aktivierung führte zur gesteigerten, dosisabhängigen Produktion der Th2 T Zell Zytokine IL-4 und IL-5 lokal in der Lunge, die durch eine BAL nachgewiesen werden können. Das ein Anstieg dieser T- Zell Zytokine auch nach dreimaliger Behandlung noch am Tag 7 nachweisbar ist, spricht für die andauernde Zytokinproduktion durch T-Zellen. Bei der kurzen Halbwertszeit von Zytokinen (wenige Stunden) wäre dieser Anstieg anders nicht zu erklären. Wiederholte Gabe von niedrig dosiertem SA führt also zu einer ständigen Aktivierung von T-Zellen und nicht zu Anergie oder deren Apoptose (Deletion der V $\beta$ 8 positiven T- Zellen), wie es bei

sehr hochdosierten i.p. Injektionen beobachtet wurde. Aus der BAL gewonnene Zellen zeigten keine typischen morphologischen Zeichen von Apoptose (Fragmentierung des Nucleus). Es besteht also die Möglichkeit, daß bei Patienten mit SA produzierenden *S. aureus* im Nasalraum SA bereits in geringen Dosen zu chronischer T- Zell Aktivierung führt, wodurch es zu entzündlich bedingten morphologischen und funktionellen Alterationen der Atemwege und des Bronchialepithels kommt.

### **C57BL/6 Mäuse entwickeln BHR nach SEB Applikation**

Bronchiale Hyperreagibilität ist ein typisches Merkmal der allergischen Reaktionen in der Lunge nach Allergenkontakt. Sie stellt das klinische Korrelat der Typ I Soforttypreaktion (nach Coombs und Gell) dar. Zu Beginn der Arbeit wurde der Effekt des SA auf die bronchiale Inflammation sowie auf die Ausbildung entzündlich bedingter BHR (nicht Allergenvermittelt) in unsensibilisierten Tieren analysiert.

Die nasale Applikation von PBS mit folgender Allergenchallenge wurde als Negativkontrolle mit der SEB Applikation (50ng/Appl) verglichen, PBS induzierte keine Entzündung was einen unspezifischen, irritativen Effekt des Lösungsmittels ausschließt. Allergenunabhängige Superantigenexposition der Atemwege und des Bronchialepithels führt zur Infiltration und Aktivierung von Lymphozyten und Makrophagen sowie Zytokinproduktion (IL-4, IL-5, TNF- $\alpha$ ) und BHR, die dem intrinsischen, nicht-allergischen AB beim Menschen ähneln ([Mattoli et al, 1991](#), [Bentley et al, 1992](#)). Die durch SA ausgelöste peribronchiale Inflammation führte zu einem signifikanten Anstieg der BHR in C57BL/6 Mäusen. Dieses Ergebnis spricht für einen alternativen, allergenunabhängigen Effekt der Inflammation für die Ausbildung gesteigerter AR. Es ist also nicht unbedingt eine allergische Sensibilisierung mit IgE Produktion und Vernetzung der AK auf Mastzellen notwendig um BHR zu induzieren. Die zugrundeliegenden Mechanismen sind in Abb. 20 dargestellt.

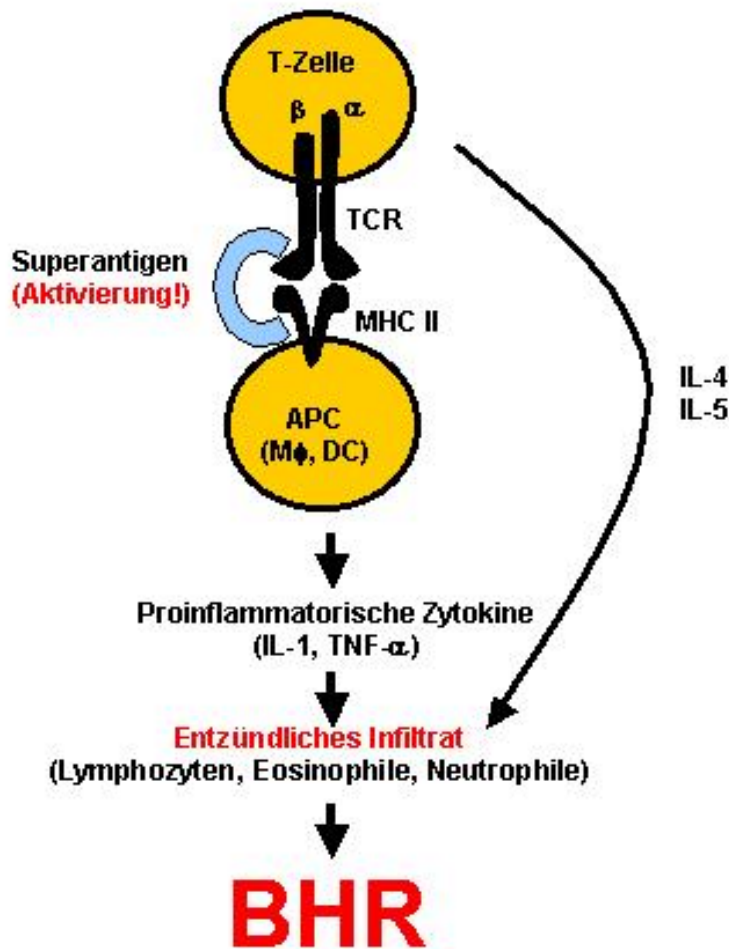


Abb. 20:

Modell des **intrinsischen** AB. Lokal appliziertes SA gelangt nach der Applikation in die Lunge und bindet an die  $\beta$ -Kette des T-Zell Rezeptors (TCR) sowie an MHC II Moleküle auf Antigenpräsentierenden Zellen (APC, M $\phi$  = Makrophagen, DC = Dendritische Zellen). Beide Zellen werden durch das SA aktiviert, T-Zellen produzieren IL-4 und IL-5, typische TH2 Zytokine und normalerweise assoziiert mit allergischer Sensibilisierung. Die APC produzieren proinflammatorische Zytokine (IL-1, TNF- $\alpha$ ) welche chemotaktisch wirken, und zu einer lymphozytären und granulozytären Inflammation führen. Freisetzung gewebstoxischer Mediatoren (Leukotriene, Prostaglandine....) aus den Zellen des entzündlichen Infiltrats führt letztendlich zu einer zellulären Immunantwort mit BHR - unabhängig von einer allergischen Sensibilisierung.

SA Exposition der Lunge, welche durch Besiedlung des Nasen - Rachenraumes von Patienten mit SA Produzierenden Bakterien durchaus von klinischer Relevanz ist, scheint also von nicht unerheblicher Bedeutung bei AB zu sein. Weitere klinische Studien sollten zur Untersuchung des Patientenguts mit intrinsischem AB erfolgen um die Besiedlung mit SA bildenden S. Aureus oder andern SA bildenden Bakterien zu untersuchen. Der Einsatz von Antibiotika sollte also zur Eradikation von lokalen Bakterienbesiedlungen in Erwägung gezogen werden, da schwere, SA induzierte Inflammation und BHR verhindert oder supprimiert werden könnte.

Auf Grund dieser Daten kann dieses hier etablierte Mausmodell, mit nasaler SEB Applikation, zu weiteren Studien über intrinsisches, nicht-allergisches AB angewandt werden.

### **Lokale SEB Behandlung verstärkt allergische Inflammation und BHR in OVA - Sensibilisierten C57BL/6 Wt Mäusen**

Die intraperitoneale Injektion von OVA stellt eine etablierte und anerkannte Methode dar, um eine allergische Sensibilisierung in Mäusen zu induzieren. Die Immunantwort gegen das Allergen wird durch  $\text{Al(OH)}_3$  als Adjuvans verstärkt ([Beck und Spiegelberg](#) 1989).

In C57BL/6 Wt Mäusen induzierte die i.p. Sensibilisierung eine humorale Immunantwort mit einem Anstieg des Gesamt-IgE und der allergenspezifischen, anti-OVA - IgE/IgG1/IgG2a Titer, wodurch die Tauglichkeit dieses Modells für weitere Untersuchungen des allergischen AB gezeigt werden konnte. Als nächstes wurde die Komposition des entzündlichen Infiltrats in der Lunge OVA sensibilisierter Tiere nach lokaler Allergenchallenge analysiert. Ohne SA Applikation wurde in sensibilisierten C57BL/6 nur eine schwache Inflammation der Atemwege induziert. Die zelluläre Differenzierung entsprach dem Bild einer allergischen Inflammation, es konnte ein signifikanter Influx von Eosinophilen Granulozyten nachgewiesen werden. Die Konzentration der Zytokine IL-4 und IL-5 stieg signifikant an,  $\text{IFN-}\gamma$  zeigte keinen Anstieg nach der Sensibilisierung. Aufgrund dieses Zytokinmusters und der Infiltration von Eosinophilen Granulozyten erfolgte der Nachweis einer lokalen allergischen Reaktion in der Lunge. Allerdings zeigte der geringe Grad der Inflammation und die histologische Untersuchung der Lunge, daß alleinige pulmonale Allergenexposition nicht hinreichen ist zur Ausbildung des Vollbildes der allergischen Inflammation beim Menschen. Daß hierbei auch genetische Unterschiede eine nicht unerhebliche Rolle spielen konnte auch in diesem Mausmodell gezeigt werden. Balb/c Mäuse wurden mit dem selben Protokoll OVA sensibilisiert und behandelt wie in dieser Arbeit beschrieben und mit C57BL/6 Mäusen verglichen ([Herz et al](#), 1998). Nach Allergenchallenge und BAL zeigten die Balb/c eine wesentlich stärkere Inflammation in der Lunge, höhere Zytokintiter in der BAL sowie eine höher AK Produktion. Somit können natürlich auch genetische Differenzen den Grad der Inflammation bestimmen, unabhängig von zusätzlichen Triggerfaktoren. Die sensibilisierten Tiere zeigten einen potenzierenden Effekt der lokalen SEB Behandlung auf die zelluläre, inflammatorische Komponente der BAL, die Zahl der Eosinophilen Granulozyten sowie der Lymphozyten stieg stark an, ebenso die Konzentration der Zytokine IL-4 und IL-5 in der BAL.

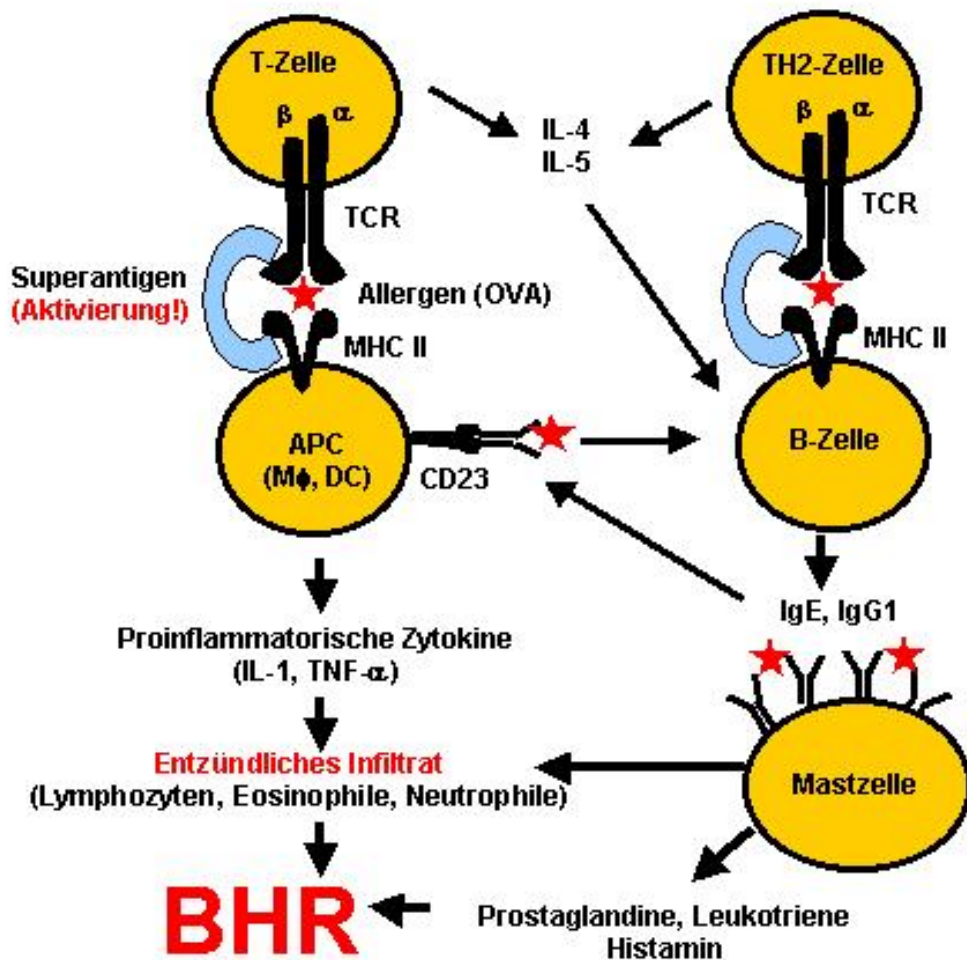


Abb. 21:

Modell des **extrinsischen** AB. Zusätzlich zu den in Abb. 20 beschriebenen Proinflammatorischen Mechanismen durch die SA Wirkung auf T-Zellen und APC erfolgt hier zusätzlich eine allergische Sensibilisierung mit dem Modellallergen OVA (roter Stern). Die durch dieses Allergen induzierte humorale Immunantwort (mit B-Zell Aktivierung und damit Produktion von IgE/IgG1 Immunglobulinen) wirkt synergistisch mit der zellulären Immunantwort (T-Zell und APC Aktivierung durch SA) und verstärkt die Entzündungsreaktion und die BHR.

Diese Ergebnisse zeigen, daß SEB als Triggerfaktor einer bestehenden Th2 Typ allergischen Reaktion wirkt. Die proallergische Komponente des Zytokinmusters und des zellulären Infiltrates wird durch SA synergistisch verstärkt, was weiterhin klar durch die selektive Akkumulation von Th2 CD4<sup>+</sup> Lymphozyten (IL-4 und IL-5 Produktion) und nicht Th1 CD4<sup>+</sup> Lymphozyten (keine gesteigerte IFN-γ Produktion) nach OVA+SEB-Behandlung gezeigt werden konnte. Dieser Effekt bestätigt die chemotaktisch durch proallergische Zytokine induzierte spezifische Adhesion und Migration von Th2 Lymphozyten, wie sie für AB im Menschen charakteristisch ist.

Die bronchiale Hyperreagibilität repräsentiert die allergische Typ I (Soforttyp-) Reaktion, die nach Vernetzung von Immunglobulinen auf Mastzellen abläuft. Ihre Ausbildung erfolgt nach der Allergenchallenge ([Renz et al, 1992](#)) und ist an die Th2 induzierten Immunglobulinklassen IgE und IgG1

([Oshiba et al](#), 1995) gebunden.

Die Messung der BHR ergab in den C57BL/6 Mäusen einen signifikanten Anstieg nach OVA Sensibilisierung und Allergenchallenge. Auch für die bronchiale Hyperreagibilität kann ein synergistische Effekt der SEB Applikation gezeigt werden, da eine signifikante Steigerung der BHR gegenüber alleiniger OVA - Sensibilisierung besteht.

SA, welches in die Lunge gelangt kann also als zusätzlicher Triggerfaktor einer vorbestehenden allergischen Reaktion in der Lunge wirken. Die Aktivierung von T Zellen im Bereich einiger Prozent durch SEB im Vergleich zu den bei allergischen Sensibilisierungen aktivierten T Zellen (ca. 0,001%) führt dann zu einer dramatischen Exazerbation eines bestehenden allergischen AB. Die Folgen für Asthmapatienten können fatal sein, was wiederholt die Bedeutung von klinischen Studien aufzeigt, welche bakterielle Besiedlung des Patienten und SA Produktion untersuchen sollten. Therapeutische Antibiotikagabe sollte dann bei diesen Patienten zur Verbesserung der Symptome und damit zur Verbesserung der Gesamtprognose eines chronischen, extrinsischen AB beitragen

### **Einfluß des CD23 Rezeptors auf die SEB Wirkung**

Der Low Affinity IgE Rezeptor spielt eine bedeutende Rolle in IgE vermittelten allergischer Reaktionen. In CD23<sup>-/-</sup> Mäusen führt die nasale SEB Applikation wie in den Wt Tieren zu einem Anstieg der Gesamtzellzahl in der BAL, bei der Zelldifferenzierung ist ein signifikanter Unterschied feststellbar, Neutrophile Granulozyten und Makrophagen zeigen einen wesentlich geringeren Anstieg im Vergleich zu den Wt Tieren. IL-4 und IL-5 Konzentration hingegen steigen wie in den Wt Tieren dosisabhängig an.

Erstaunlicherweise entwickelten die CD23<sup>-/-</sup> Tiere keine BHR. Die geringe TNF- $\alpha$  Produktion in CD23<sup>-/-</sup> Mäusen könnte einen Mechanismus repräsentieren, der für die BHR verantwortlich ist ([Lukacs et al](#), 1995; [Cascale et al](#), 1996), da die Instillation von TNF- $\alpha$  in die Trachea als suffizient für die Ausbildung bronchialer Hyperreagibilität in Ratten demonstriert werden konnte ([Kips et al](#), 1992). Das Entfernen des CD23 Rezeptors führt zu einer verringerten Aktivierung von Makrophagen b.z.w. Dendritischen Zellen und damit zum Verlust der Induktion inflammatorischer Zytokine ([Lecoanet-Henchoz et al](#), 1995; [Herbelin et al](#), 1994; [Armant et al](#), 1994). Pulmonale Inflammation (mit Lymphozyten und Eosinophilen) alleine ist also (zumindest in diesem Modell) nicht hinreichend für erhöhte AR. Ein signifikanter Unterschied zwischen Wt und CD23<sup>-/-</sup> Tieren zeigte sich in der Zahl der Neutrophilen und der Makrophagen, die in den CD23<sup>-/-</sup> Tieren geringer war.

Die für den CD23 Rezeptor demonstrierte Rolle bei der Antigenpräsentation für B Zellen und ein daraus resultierender Anstieg der IgE Produktion ([Lamers and Yu](#), 1995) konnte in dem hier benutzten OVA Mausmodell nicht bestätigt werden. Dies ist in erster Linie auf Differenzen der verwendeten Modelle zurückzuführen, zeigt aber weiteren Forschungsbedarf über die genaue Rolle des CD23 Rezeptors bei der allergischen Sensibilisierung und der IgE Produktion.



In den CD23<sup>-/-</sup> Tieren konnte auch die additive SEB Behandlung die AR nicht beeinflussen, es war kein Unterschied zur Kontrollgruppe zu verzeichnen. Da nach dieser Behandlung die TNF- $\alpha$  Konzentration in den CD23<sup>-/-</sup> Mäusen weit unter dem Wert der Wt Tiere lag, und die Konzentration sich wie die AR in allen Behandlungsgruppen nicht veränderte kann ein essentieller Einfluß dieses proinflammatorischen Zytokins abgeleitet werden. Damit zeigt die normale Reaktion der CD23 defizienten Tiere, ohne BHR nach Sensibilisierung, einen bedeutenden Einfluß des Low affinity IgE Rezeptors für die BHR. Mithin kann die Präsenz des CD23 Rezeptors für die Entwicklung der BHR als essentiell angesehen werden, jedoch verläuft die Aktivierung von T-Zellen (IL-4 und IL-5 Produktion) unabhängig von der Wirkung des CD23 Moleküls.

Somit läßt sich aus den in CD23<sup>-/-</sup> gewonnenen Daten schlußfolgern, daß allergenspezifischen IgE und IgG1 Antikörper, IL-4 und IL-5 Produktion sowie der Influx von Lymphozyten und Eosinophilen Granulozyten zwar eine wichtige, aber nicht hinreichende Voraussetzung für erhöhte BHR sind. Abbildung 22 zeigt ein Modell der Interaktion der beteiligten Zellen, Unterschiede zu den Wt Tieren und fehlende/verminderte Wechselbeziehungen zwischen den beteiligten Zellen sind in grau dargestellt.

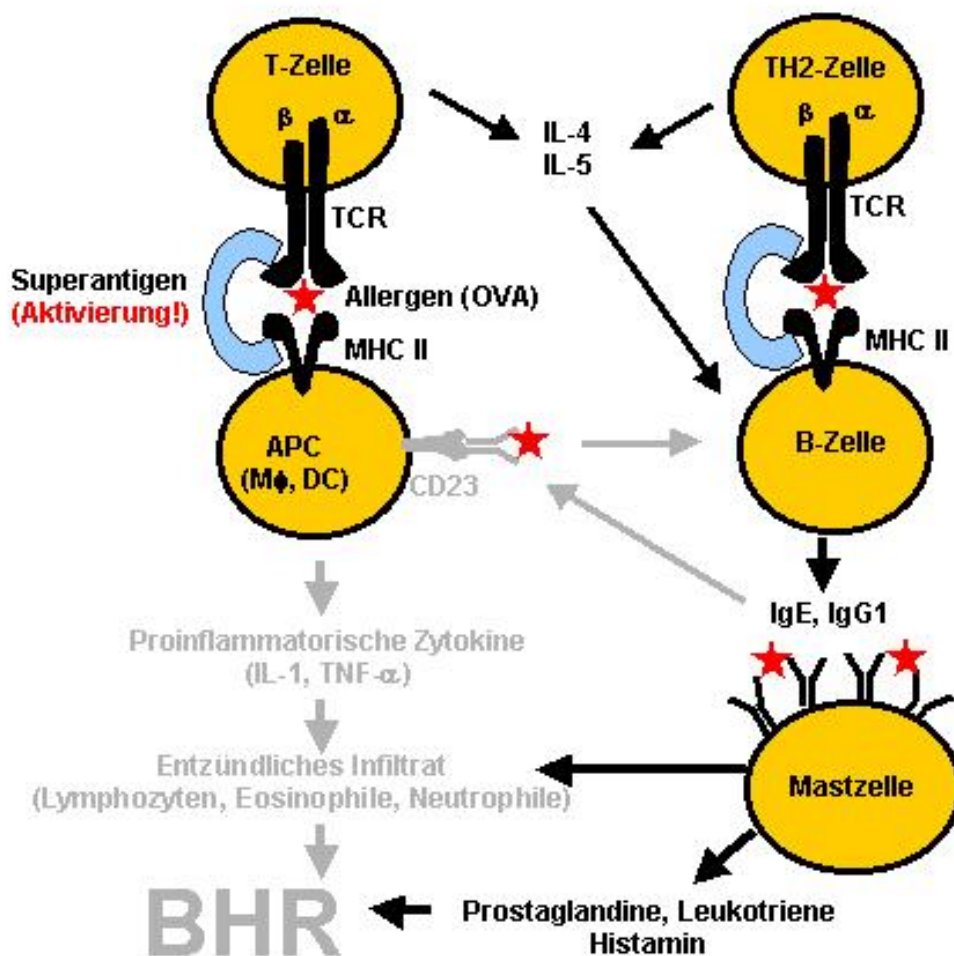


Abb. 22:

Modell für Defekte der CD23<sup>-/-</sup> Mäuse. Sensibilisierung und Behandlung der Tiere erfolgte äquivalent zu den C57BL/6 Wt Mäusen (Abb. 21). Die in CD23<sup>-/-</sup> fehlenden oder verringerte Komponenten im Vergleich

zu Wt Mäusen (Abb. 21) sind in grau dargestellt. Es konnte nur ein geringer Effekt des CD23 Moleküls auf die humorale Immunantwort eruiert werden, sowohl IgE/IgG1 Antikörper als auch die Th2 Zytokine IL-4 und IL-5 werden nach allergischer Sensibilisierung produziert. Im Gegensatz dazu ist die zelluläre Immunantwort supprimiert. Es konnte nur eine stark reduzierte Inflammation beobachtet werden (Teilweise durch mangelnde TNF- $\alpha$  Produktion der APC). Durch das Fehlen dieser Komponente kam es - trotz IgE/IgG1 Produktion - nicht zu der Ausbildung einer BHR.

## TNF- $\alpha$

Eine Aktivierung der Makrophagen wurde durch den Anstieg der TNF- $\alpha$  Konzentration dokumentiert ([Kelly et al, 1990](#)). Der in der BAL nachgewiesene Influx von Lymphozyten, in Verbindung mit dem Zytokinprofil, spricht für einen selektiven Effekt des SEB auf die Migration von Th2 CD4<sup>+</sup> Zellen (die als Hauptproduzenten des in der BAL nachgewiesenen IL-4 und IL-5 gelten). Kips *et al* konnten die gesteigerte Adhäsion von SEB reaktiven CD4<sup>+</sup> V $\beta$ 8<sup>+</sup> Zellen an durch SA aktiviertes Epithel zeigen ([Kips et al, 1996](#)). *In Vivo* konnte auch ein rapider Anstieg der TNF- $\alpha$  Produktion durch CD4<sup>+</sup> T Zellen in Lymphknoten nachgewiesen werden ([Litton et al, 1994](#)). TNF- $\alpha$  aktiviert, synergistisch mit IL-4 die Expression von ICAM-1 ([Tosi et al, 1992](#)) und VCAM-1, und damit die Adhäsion und Migration von eosinophilen und neutrophilen Granulozyten in das Lungeninterstitium und die Atemwege. Weiterhin spielen die durch TNF- $\alpha$  regulierten  $\beta_2$ -Integrine auf dem Bronchialepithel eine bedeutende Rolle für die Adhäsion von eosinophilen Granulozyten ([Goddling et al, 1995](#)). Ab einer Menge von 50ng SEB/Applikation, die zu einem signifikanten Anstieg der Zytokinkonzentration in der BAL führte, konnte synergistisch ein starker Anstieg der Eosinophilen/Neutrophilen in der BAL nachgewiesen werden. Da auch in der Histologie ein dosisabhängiger Anstieg der Inflammation belegt werden konnte, wirkt die lokale SEB induzierte TNF- $\alpha$  Produktion als potenter Triggerfaktor einer Th2 - Typ Inflammation.

Eine Diskrepanz in der TNF- $\alpha$  Produktion besteht zwischen C57BL/6 Wt und CD23 -/- Mäusen. Es wurde eine niedrigere Baseline-Konzentration in CD23 -/- gefunden, die auch nach SEB oder OVA Behandlung nicht ansteigt, wie in den Wt Tieren beobachtet. Da die Zahl der Makrophagen vergleichbar ist muß die geringere Produktion an TNF- $\alpha$  auf verminderte oder fehlende Aktivierung von Makrophagen in CD23-/- Mäusen für diesen Effekt verantwortlich sein, da Makrophagen die Hauptquelle für TNF- $\alpha$  darstellen. Dies zeigt, zumindest im Mausmodell, eine große Relevanz des CD23 Rezeptors, der v.a. auf Dendritischen Zellen und Makrophagen (also auf antigen-präsentierenden Zellen) exprimiert wird, für die Induktion der TNF- $\alpha$  Produktion. Aktivierung von Peritonealmakrophagen und IL-6 Produktion konnte nach Bindung von murine CD23 an das auf Makrophagen exprimierte Adhäsionsmolekül CD11b demonstriert werden ([Lecoanet-Henchoz et al, 1995 und 1997](#)), ein Mechanismus der auch bei Alveolarmakrophagen in dem hier angewandten Modell von Relevanz sein könnte. Da das zelluläre Infiltrats sich in der Zahl der Eosinophilen Granulozyten und der Lymphozyten in CD23-/- und Wt sich nicht signifikant unterscheiden kann die Produktion von TNF- $\alpha$  nicht essentiell für die Ausbildung der Inflammation in der Lunge sein. Dies zeigt die Redundanz der Pro - Inflammatorischen Mediatoren bei Entzündungen, wo andere lösliche Faktoren oder andere Prozesse die TNF- $\alpha$  Wirkung übernehmen.



# Zusammenfassung

Hauptfragestellung vorliegender Arbeit war die Untersuchung des Einflusses von ubiquitär verbreiteten Bakterien sezernierten Superantigens auf die Exazerbation oder Induktion von intrinsischem oder extrinsischem Asthma Bronchiale (AB). Die klinische Relevanz dieser Fragestellung wird durch die Beobachtung bakteriell bedingter Superinfektionen unterstrichen, die zu einer Zunahme der Symptome allergischer Inflammationen führen, und auf die Therapie mit Antibiotika ansprechen. Bis zu diesem Zeitpunkt gab es keine Arbeiten, die Superantigene als Triggerfaktor bei AB untersuchten.

Aufgrund meiner Ergebnisse kann ein bedeutender Einfluß des von Bakterien sezernierten bakteriellen Superantigens auf die Exazerbation einer bestehenden allergischen Inflammation in der Lunge und die Ausbildung bronchiale Hyperreagibilität bewiesen werden. Die aufgestellten Arbeitshypothesen konnte damit in allen Punkten bestätigt werden.

Die durch Superantigen alleine induzierte Inflammation mit Anstieg von IL-4 und IL-5, Eosinophilen Granulozyten und Lymphozyten in der BAL sowie signifikanter BHR ähnelt dem intrinsischen, nicht allergischen AB, womit diese Modell zur weiteren Untersuchung der Pathophysiologie des intrinsischen AB dienen kann. Außerdem legt es neue Therapieansätze durch Antibiotika nahe, falls im Nasenabstrich SA produzierende Bakterien nachgewiesen werden können.

Ein klinisch möglicherweise sehr bedeutender Befund betrifft die Rolle des Low Affinity IgE Rezeptors CD23 für die Ausbildung bronchialer Hyperreagibilität. In den gentechnisch generierten CD23 Knock Out (-/-) Mäusen induzierte die allergische Sensibilisierung und die Behandlung mit SEB keine BHR, trotz der vorhandenen, allergenspezifischen IgE und IgG1 Antikörper, eine erstmalig beschriebene zentrale Rolle für die BHR im Mausmodell. Aus diesen Erkenntnissen lassen sich mindestens zwei Wege mit unterschiedlichen Effektoren für die Ausbildung bronchialer Hyperreagibilität ableiten: IgE/IgG1 vermittelt oder ohne allergische Komponente durch TNF- $\alpha$ , die sich aber synergistisch über den Low affinity IgE Rezeptor (CD23) gegenseitig beeinflussen und potenzieren. Auch dieser Effekt bedarf weiterer Untersuchung für die sich die Option der Blockierung des Rezeptors mit spezifischen Antikörpern und damit die Behandlung schwerer asthmainduzierter Ateminsuffizienz abzeichnet.

Weiterhin wurde für TNF- $\alpha$  eine essentielle Rolle in der Pathogenese von AB gezeigt. Dieses proinflammatorische Zytokin ist nicht essentiell für die allergische Inflammation aber notwendig für die Induktion bronchialer Hyperreagibilität. Diese seit kurzem auch in der Literatur diskutierten Effekte sollten zu einer verstärkten Beachtung dieses zentralen Immunmodulators in der Forschung und der Therapie von AB beitragen.

Die Relevanz dieser Erkenntnis beim AB bedarf weiterer Untersuchungen und nachfolgender klinischer

Studien. Werden Beweise für die Beteiligung bakterieller Superantigene im Menschen, vergleichbar mit den hier vorgelegten Ergebnissen aus dem Tiermodell gefunden, können neue oder erweiterte Therapiekonzepte zu einer wesentlichen Verbesserung der Situation von Patienten mit nichtatopischem, intrinsischem sowie atopischem, extrinsischem Asthma beitragen.

## Literatur

- Aberg N, B. Lundbäck, C. Möller, B. Aberg, Göteborg and Umea, Sweden. 1996 Abstract: Annual Meeting of the European Academy of Allergology and Clinical Immunology; EAACI 96; Budapest, Hungary. June 1996.
- Armant M, H. Ishihara, et al. 1994. Regulation of cytokine production by soluble CD23: costimulation of interferon gamma secretion triggering tumor necrosis factor  $\alpha$  release. *J. Exp. Med.* 180: 1005-1011.
- Aubry J.-P, S. Pochon, et al. 1992. CD21 is a ligand for CD23 and regulates IgE production. *Nature* 358: 505-507.
- Ayliffe G.A.J, B.D. Cookson, et al. 1986. Guidelines for the control of epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Hosp. Infect.* 7: 193-201.
- Beck L, and H.L. Spiegelberg. 1998. The polyclonal and antigen-specific IgE and IgG subclass response of mice injected with ovalbumin in alum or complete Freud's adjuvant. *Cell. Immunol.* 123: 1-8.
- Bentley A.M., Menz G., et al. 1992. Identification of T lymphocytes, macrophages and activated eosinophils in bronchial mucosa in intrinsic asthma. *Am Rev Respir. Dis.* 146: 500-506.
- Bousquet J, P. Chanez, et al. 1990. Eosinophilic inflammation in asthma. *N. Engl. J. Med.* 323: 1033.
- Bradley BL, Azzawi M, et al. 1991. Eosinophils, T lymphocytes, mast cells, neutrophils and macrophages in bronchial biopsy specimens from atopic asthma: comparison with biopsy specimens from atopic subjects without asthma and normal control subjects and relationship to bronchial hyperresponsiveness. *J. Allergy. Clin. Immunol.* 88: 661-674.
- Braun A, Appel E, et al. 1998. Role of nerve growth factor in a mouse model of allergic airway inflammation and asthma. *Eur J Immunol* 28:3240-51.
- Brinkmann V, C. Kristofic. 1995. TCR-stimulated naive human CD4<sup>+</sup>45R0<sup>-</sup> T cells develop into effector cells that secrete IL-13, IL-5, and IFN- $\gamma$ , but no IL-4, and help efficient IgE production by B cells. *J. Immunol.* 154: 3078-3087.
- Broide D, M.M. Paine, and G.S. Firestein. 1992. Eosinophils express interleukin-5 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor mRNA at sites of allergic inflammation in asthmatics. *J. Clin. Invest.* 90: 1414-1424.
- Broide D.H, M. Lotz, and A.J. Cuomo. 1992. Cytokines in symptomatic asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 89: 958-967.
- Bujanowski-Weber J, I. Knöller, et al. 1990. Correlation of sCD23 release and immunoglobulin (E, A, G, M) synthesis by peripheral blood lymphocytes of atopic patients. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 92:113-118.
- Cascale TB, J.J. Costa and Galli S. 1996. TNF- $\alpha$  is important in human lung allergic reactions. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 15: 35-44.
- Capron M, A.S. Gounni, et al. 1995. Eosinophils: from low- to high-affinity immunoglobulin E receptors. *Allergy.* 50: 20-23.
- Costa J.J, K. Matossian, et al. 1993. Human eosinophils can express the cytokines tumor necrosis factor- $\alpha$  and macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$ . *J. Clin. Invest.* 91: 2673-2684.
- Coyle A.J, S.J. Ackerman, et al. 1995. Human eosinophil - granule major basic protein and synthetic polycations induce airway hyperresponsiveness in vivo dependent on bradykinin generation. *J. Clin. Invest.* 95: 1735-1740.

- Cromwell O, Q. Hamid, et al. 1992. Expression and generation of interleukin-8, IL-6 and granulocyte colony-stimulating factor by bronchial epithelial cells and enhancement by IL-1 $\beta$  and tumor necrosis factor- $\alpha$ . *Immunology*. 77: 330-337.
- Daser A, Meissner N, et al. 1995. Role and modulation of T-cell cytokines in allergy. *Curr. Opin. Immunol.* 7: 762-770.
- De Sanctis G.T, M. Merchant, et al. 1995. Quantitative locus analysis of airway hyperresponsiveness in A/J and C57BL/6J mice. *Nature Genetics* 11: 150-154.
- Desremaux P. A. Janin, et al. 1992. Interleukin-5 messenger RNA expression by eosinophils in the intestinal mucosa of patients with coeliac disease. *J. Exp. Med.* 175: 293-296.
- Djukanovic R, Wilson JW, et al. 1990. Quantification of mast cells and eosinophils in the bronchial mucosa of symptomatic atopic asthmatics and healthy control subjects using immunohistochemistry. *Am. Rev. Respir. Dis.* 142: 863-871.
- Flores-Romo L, J. Shields, et al. 1993. Inhibition of an in vivo antigen-specific IgE response by antibodies to CD23. *Science* 261: 1038.
- Godding V, J.M. Stark, et al. 1995. Adhesion of activated eosinophils to respiratory epithelial cells is enhanced by tumor necrosis factor- $\alpha$  and interleukin-1  $\beta$ . *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 13: 555-562.
- Grünig G, Warnock M, et al. 1998. Requirement for IL-13 Independently of IL-4 in Experimental Asthma. *Science* 282 2261-2263.
- Gustavson S, Hjulström S, et al. 1994. CD23/IgE-mediated regulation of the specific antibody response in vivo. *J. Immunol.* 152:4793-4800.
- Hallsworth M.P, T.M. Litchfield and T.H. Lee. 1992. Glucocorticosteroids inhibit granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-5 enhanced in vitro survival of human eosinophils. *Immunology*. 75: 382-385.
- Harding C.V. and R. Song. 1994. Phagocytic processing of exogenous particulate antigens by macrophages for presentation by class I MHC molecules. *J. Immunol.* 153: 4925-4933.
- Hakansson L, E. Björnsson, et al. 1995. Increased adhesion to vascular cell adhesion molecule-1 and intracellular adhesion molecule-1 of eosinophils from patients with asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 96: 941-950.
- Herbelin A, S. Elhadad, et al. 1994. Soluble CD23 potentiates interleukin-1 secretion of interleukin-6 and interleukin-1 receptor antagonist by human monocytes. *Eur. J. Immunol.* 24, 1869-1873.
- Herz U, Lupp U, et al. 1996. The relevance of murine animal models to study the development of allergic bronchial asthma. *Immunology and Cell Biology* 74: 209-217.
- Herz U, Schnoy N, et al. 1998. A human-SCID mouse model for allergic immune response: bacterial superantigen enhances skin inflammation and suppresses IgE production. *J. Invest. Dermatol.* 110:224-31.
- Herz U., Braun A., Rückert R., and Renz H. 1998. Various immunological phenotypes are associated with increased airway responsiveness. *Clin. Exp. Allergy*, 28: 625-30
- Herz U, Rückert R, et al. 1999. Airway exposure to bacterial superantigen (SEB) induces lymphocyte-dependent airway inflammation associated with increased airway responsiveness--a model for non-allergic asthma. *Eur J Immunol* 29:1021-31
- Hossain M, Y. Okubo, et al. 1996. Analysis of recombinant human tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced CD4 expression on human eosinophils. *Immunology*. 88: 301-307.
- Iademarco M.F, J.L. Barks and D.C. Dean. 1995. Regulation of Vascular cell adhesion molecule-1 expression by IL-4 and TNF- $\alpha$  in cultured endothelial cells.

- J. Clin. Invest.* 95: 264-271.
- Jeffrey PK, Wardlaw AJ, et al. 1989. Bronchial biopsies in asthma. An ultrastructural quantitative study and correlation with hyperreactivity. *Am. Rev. Respir. Dis.* 140: 1745-1735.
- Kelly J, 1990. Cytokines of the Lung. *Am. Rev. Respir. Dis.* 141: 765-788.
- Kips J.C, J. Tavernier and R.A. Powels. 1992. Tumor necrosis factor causes bronchial hyperresponsiveness in rats. *Am. Rev. Resp. Dis.* 145: 332-336.
- Kita M, E, Eguchi, et al. 1996. Staphylococcal enterotoxin B-specific adhesion of murine splenic T cells to a human endothelial cell line. *Immunology* 88: 441-446.
- Kohler I, and E.P. Rieber. 1993. Allergy-associated IgE and Fcε receptor II (CD23b) genes activated via binding of an interleukin-4 induced transcription factor to a novel responsive element. *Eur. J. Immunol.* 23: 3066-3071.
- Kopf M, G. Le Gros, et al. 1993. Disruption of the murine IL-4 gene blocks Th2 cytokine response. *Nature* 362: 245.
- König B, K. Neuber and W. König. 1995. Responsiveness of peripheral blood mononuclear cells from normal and atopic donors to microbial superantigens. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 106: 124-133.
- Kühn, R, K. Rajewsky, and W. Müller. 1991. Generation and analysis of Interleukin-4 deficient mice. *Science* 254: 707-710.
- Kung T.T, D.M. Stelts, et al. 1995. Involvement of IL-5 in a murine model of allergic pulmonary inflammation: prophylactic and therapeutic effect of an anti-IL-5 antibody. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 13: 360-365.
- Lamers MC, and Yu P. Regulation of IgE synthesis. Lessons from the study of IgE transgenic and CD23-deficient mice. 1995 *Immunological Reviews* 148: 71-95.
- Larsen GL, Renz H, et al. 1992. Airway response to electrical field stimulation in sensitized inbred mice. *J Clin Invest.* 89: 747-752 .
- Lebman D.A, A. Lebman and R.L. Coffmann. 1988. Interleukin-4 causes isotyp switching to IgE in T cell-stimulated clonal B cell cultures. *J. Exp. Med.* 168: 853-862.
- Lecoanet-Henchoz S, J.F. Gauchat, et al. 1995. CD23 regulates monocyte activation through a novel interaction with the adhesion molecules CD11b-CD18 and CD11c-CD18. *Immunity* 3: 119-125.
- Lecoanet-Henchoz S, Plater-Zyberk C, et al. 1997. Mouse CD23 regulates monocyte activation through an interaction with the adhesion molecule CD11b/CD18. *Eur J Immunol* 27:2290-2294.
- Lefort J, M.A. Nahori, et al. 1996. In vivo neutralization of eosinophil-derived major basic protein inhibits antigen induced bronchial hyperreactivity in sensitized guinea pigs. *J. Clin. Invest.* 97:1117-1121.
- Lefort J, C.M. Bachelet, et al. 1996. Effect of antigen provocation of IL-5 transgenic mice on eosinophil mobilization and bronchial hyperresponsiveness. *J. Allergy Clin. Immunol.* 97: 788-799.
- Lester M.R, M.F. Hofer, et al. 1995. Modulatory effects of staphylococcal superantigen TSST-1 on IgE synthesis in atopic dermatitis. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 77:332-338.
- Leung D. Y. M, H.C. Meissner, et al. 1993. Toxic shock syndrome toxin-secreting *Staphylococcus aureus* in Kawasaki syndrome. *Lancet* 342: 1385-1387.
- Leung D.Y.M, P. Walsh, et al. 1993 a. A potential role for superantigens in the pathogenesis of psoriasis. *J. Invest. Dermatol.* 100: 225-228.
- Leung D.Y.M, R. Harbeck, et al. 1993 b. Presence of IgE antibodies to staphylococcal enterotoxins on the

- skin of patients with atopic dermatitis: evidence for a new group of allergens. *J. Clin. Invest.* 92:1374-1380.
- Leung, D.Y.M, M. Gately, et al. 1995. Bacterial superantigens induce T cell expression of the skin-selective homing receptor, the cutaneous lymphocyte-associated antigen, via stimulation of interleukin 12 production. *J. Exp. Med.* 181:747-753.
- Leyden J.L, R. R. Marpeles and A.M. Kligman. 1974. Staphylococcus aureus in the lesions of atopic dermatitis. *Br J Dermatol.* 90: 525-530.
- Litton M.J, B. Sanders, et al. 1994. Early expression of cytokines in lymph nodes after treatment in vivo with Staphylococcal enterotoxin B. *J. Immunol. Methods.* 175: 47-58.
- Lukacs N.W, R.M. Strieter, et al. 1995. TNF- $\alpha$  mediates recruitment of neutrophils and eosinophils during airway inflammation. *J. Immunol.* 154: 5411-5417.
- Mattoli S., Mattoso V.L., et al. 1991. Cellular and biochemical characteristic of bronchoalveolar lavage fluid in symptomatic non-allergic asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 87: 794-802.
- Meissner, N., F. Kussebi, T. Jung, H. Ratti et al. 1997. A subset of CD8+ T cells from allergic patients produce IL-4 and stimulate IgE production in vitro. *Clin-Exp-Allergy* 27: 1402-1411.
- Miethke T, C. Wahl, et al. 1992. T-cell mediated lethal shock triggered in mice by the superantigen staphylococcal enterotoxin B: critical role of tumor necrosis factor. *J. Exp. Med.* 175:91-98.
- Miethke T, C. Wahl, et al. 1993. Acquired resistance to superantigen - induced T cell shock. *J. Immunol.* 150: 3776-3784.
- Moqbel R, Q. Hamid, et al. 1991. Expression of mRNA and immunoreactivity for the granulocyte/macrophage colony stimulating factor in activated human eosinophils. *J. Exp. Med.* 174: 749-752.
- Möller G.M, T.A.W. de Jong, et al. 1996. Immunolocalization of Interleukin-4 in eosinophils in the bronchial mucosa of atopic asthmatics. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 14: 439-443.
- Mosmann T.R, H. Cherwinski, et al. 1986. Two types of murine helper T cells clones. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J. Immunol.* 136: 2348-2357.
- Mudde G.C., R. Bheekha, C.A. Bruijnzeel-Koomen. 1995. Consequences of IgE/CD23-mediated antigen presentation in allergy. *Immunol Today* 16:380-383.
- Neuber K, K. Steinrücke and J. Ring. 1995. Staphylococcal enterotoxin B affects in vitro IgE synthesis, Interferon- $\gamma$ , Interleukin-4 and Interleukin-5 production in atopic eczema. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 107: 179-182.
- Ohno I, Y. Ohkawara, et al. 1990. Production of tumor necrosis factor with IgE receptor triggering from sensitized lung tissue. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 3: 285-289.
- Okayama Y, C. Petit-Frère, et al. 1995. IgE dependent expression of mRNA for IL-4 and IL-5 in human lung mast cells. *J. Immunol.* 155: 1796-1808.
- Oshiba A, E. Hamelmann, et al. 1996. Passive transfer of immediate hypersensitivity and airway responsiveness by allergen-specific immunoglobulin (Ig) E and IgG1 in mice. *J. Clin. Invest.* 97: 1398-1408.
- Paliard X, S.G. West, et al. 1991. Evidence for the effects of a superantigen in rheumatoid arthritis. *Science* 253: 325-329.
- Pfeil T, A. Fischer, et al. 1989. Effects of cytokines on spontaneous and allergen-induced CD23 expression, sCD23 release and Ig(E,G) synthesis from peripheral blood lymphocytes. *Immunology* 68: 37-44.

- Postma D.S, E.R. Bleecker, et al. 1995. Genetic susceptibility to asthma - bronchial hyperresponsiveness coinherit with a major gene for atopy. *N. Engl. J. Med.* 333: 894-900.
- Punnonen J, G. Aversa, et al. 1993. Interleukin 13 induces interleukin 4 - independent IgG4 and IgE synthesis and CD23 expression by human B cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 3730-3734.
- Purkerson J.M, and P.C. Isakson. 1992. Interleukin-5 (IL-5) provides a signal that is required in addition to IL-4 for isotype switching to immunoglobulin (Ig) G1 and IgE. *J. Exp. Med.* 175: 973-982.
- Renz H, Smith HR, et al. 1992. Aerosolized antigen exposure without adjuvant causes increased IgE production and increased airway responsiveness in the mouse. *J Allergy Clin Immunol.* 89: 1127-1138.
- Renz H, Enssle K, et al. 1995. Inhibition of allergen-induced IgE and IgG1 production by soluble IL-4 receptor. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 106:46-54.
- Roisman G.L, C. Pfeiffer, et al. 1995. Perception of bronchial obstruction in asthmatic patients. *J. Clin. Invest.* 96: 12-21.
- Sakamoto T, F. Nakayama, et al. 1992. Fcε receptor II/CD23<sup>+</sup> lymphocytes in atopic dermatitis. Aberrant control in the in vitro expression of FcεRII/CD23 on peripheral blood T cells in atopic dermatitis. *Clin. Exp. Immunol.* 87: 87-93.
- Sanderson C.J. Interleukin-5, Eosinophils and disease. 1992. *Blood.* 3101-3109.
- Stief A, G. Texido, et al. Mice deficient in CD23 reveal its modulatory role in IgE production but no role in T and B cell development. 1994. *J. Immunol.* 152: 3378-3390.
- Sur S, G.J. Gleich, et al. 1995. Allergen challenge in asthma: association of eosinophils and lymphocytes with interleukin-5. *Allergy* 50: 891-898.
- Thornhill M.H, S.M Wellicome, et al. 1991. Tumor necrosis factor combines with IL-4 or IFN-γ to selectively enhance endothelial cell adhesiveness for T cells. The contribution of vascular adhesion molecule-1-dependent and -independent binding mechanisms. *J. Immunol.* 146: 592-598.
- Tosi M.F, S.M. Stark, et al. 1992. Induction of ICAM-1 expression on human airway epithelial cells by inflammatory cytokines: effect on neutrophil-epithelial cell adhesion. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 7: 214-221.
- Turki J, J. Pak, et al. 1995. Genetic polymorphisms of the β2-Adrenergic Receptor in nocturnal and non-nocturnal asthma. *J. Clin. Invest.* 95:1635-1641.
- Van Herwerden L, S.B. Harrap, et al. 1995. Linkage of high-affinity IgE receptor gene with bronchial hyperreactivity, even in the absence of atopy. *Lancet* 346: 1162-1165.
- Van Oosterhout A.J.M, D. Fattah, et al. 1995. Eosinophil infiltration precedes development of airway hyperreactivity and mucosal exudation after intranasal administration of interleukin-5 to mice. *J. Allergy Clin. Immunol.* 96: 104-112.
- Von Mutius E, Martinez F.D, et al. 1994. Prevalence of asthma and atopy in two areas of west and east Germany. *Am. J. Crit. Care Med.* 149: 358-364
- Walker C, E.Bode, et al. 1992. Allergic and nonallergic asthmatics have distinct patterns of T-cell activation and cytokine production in peripheral blood and bronchoalveolar lavage. *Am. Rev. Respir. Dis.* 146: 109-115.
- Werfel T., M. Hentschel, H. Renz, A. Kapp. 1997. Analysis of the phenotype and cytokine pattern of blood- and skin-derived nickel specific T cells in allergic contact dermatitis. *Int-Arch-Allergy-Immunol* 113: 384-386.
- Wills-Karp M, Luyimbazi J, 1998. Interleukin-13: Central Mediator of Allergic Asthma. *Science* 282 2258-2261.

- Woolley K.L, P.G.Gibson, et al. 1996. Eosinophil apoptosis and the resolution of airway inflammation in asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 154: 237-243.
- Yates D.H, P.J. Barnes, and P.S. Thomas. 1993. Tumor necrosis factor- $\alpha$  alters human bronchial reactivity and induces inflammatory cell influx. *Am. Rev. Resp. Dis.* 147: A1011.
- Yu P, M. Kosco-Vilbois, et al. 1994. Negative feedback regulation of IgE synthesis by murine CD23. *Nature* 369:753-756.



## Abkürzungen

- AB Asthma Bronchiale
- AK Antikörper
- APC Antigen-Präsentierende Zelle
- AR Atemwegsreaktivität
- BHR Bronchiale Hyperreaktivität
- CD Cluster of Differentiation
- CD23-/- CD23 Knock Out (C57BL/6 Mäuse ohne CD23 Rezeptor)
- Con A Conkavilin A: T Zell Stimulanz
- EFS Elektrische Feld Stimulation
- ELISA Enzyme Linked Immuno Sorband Assay
- FKS Fetales Kälberserum
- i.n. Intranasal
- i.p. Intraperitoneal
- IFN- $\gamma$  Interferon Gamma
- IL Interleukin
- MHC Major Histokompatibility Complex
- n.d. not determined (nicht bestimmt)
- OVA Ovalbumin
- PBMC Peripheral blood mononuclear cells
- PBS Phosphate Buffered Saline
- RT Raumtemperatur
- SEA Staphylococcal Enterotoxin A
- SEB Staphylococcal Enterotoxin B
- TCR T-Zell-Rezeptor
- TSM Trachealsegment
- Wt Wildtype, C57BL/6 Mäuse
- V $\beta$ 8 T Zellen mit der Variablen Kette 8 im TCR, Bindungsstelle für SEB

# PUBLIKATIONSLISTE

## Paper:

1.) Interleukin-15 protects from lethal apoptosis *in vivo*

Silvia Bulfone-Paus, Daniela Ungureanu, Thomas Pohl, Gerd Lindner, Ralf Paus, **René Rückert**, Hans Krause, and Ulrich Kunzendorf. 1997, *Nature Med*; 3: 1124

2.) MHC class I expression in murine skin: Developmentally controlled and strikingly restricted intraepithelial expression during hair follicle morphogenesis and cycling, and response to cytokine treatment *in vivo*.

**René Rückert**, Udo Hofmann, Carina van der Veen, Silvia Bulfone-Paus and Ralf Paus. 1998; *J. Invest. Dermatol.* 111: 25

3.) IL-15-IgG2b fusion protein accelerates and enhances a Th2 but not a Th1 immune response *in vivo*, while IL-2-IgG2b fusion protein inhibits both.

**René Rückert**, Udo Herz, Ralf Paus, Daniela Ungureanu, Thomas Pohl, Harald Renz, and Silvia Bulfone-Paus; 1998, *Eur. J. Immunol.* 28:3312

4.) The anagen hair cycle induces systemic immunosuppression of contact hypersensitivity in mice.

Udo Hofmann, Yoshiki Tokura, **René Rückert**, Ralf Paus; 1998. *Cell. Immunol.* 184:65

5.) Inhibition of chemotherapy-induced keratinocyte apoptosis *in vivo* by an interleukin-15-IgG fusion protein.

Gerd Lindner, **René Rückert**, Silvia Bulfone-Paus, and Ralf Paus. 1998, *J. Invest. Dermatol.*, 110: 457

6.) Various immunological phenotypes are associated with increased airway responsiveness.

Udo Herz, Armin Braun, **René Rückert**, and Harald Renz. 1998; *Clin. Exp. Allergy*, 28: 625

7.) Vaccination with tumor cells engineered to secrete Interleukin 2-Immunoglobulin G fusion protein induces tumor rejection.

Silvia Bulfone-Paus, Horst von Bernuth, **René Rückert**, Joachim Wachtlin, Daniela Ungureanu, Michael Notter, Hans Krause, Thomas Pohl, Ralf Paus, Ulrich and Kunzendorf. 1998, *Cancer Research* 58:2707

- 8.) Airway exposure to bacterial superantigen (SEB) induces lymphocyte-dependent airway inflammation associated with increased airway responsiveness--a model for non-allergic asthma.  
Herz U, **Rückert R**, Wollenhaupt K, Tschernig T, Neuhaus-Steinmetz U, Pabst R, and Renz . 1999  
*Eur J Immunol* 29:1021
- 9.) Death deflected: IL-15 inhibits TNF- $\alpha$ -mediated apoptosis in fibroblasts by TRAF2 recruitment to the IL-15R $\alpha$  chain.  
Silvia Bulfone-Paus , Elena Bulanova, Thomas Pohl, Vadim Budagyan, Horst Dürkop, **René Rückert**, Ulrich Kunzendorf, Ralf Paus, and Hans Krause; 1999 *FASEB Journal*, 12:1575
- 10.) An interleukin-2-IgG-Fas ligand fusion protein suppresses delayed-type hypersensitivity in mice by triggering apoptosis in activated T cells as a novel strategy for immunosuppression.  
Silvia Bulfone-Paus, **René Rückert**, Hans Krause, Horst von Bernuth, Michael Notter, Thomas Pohl, Tran TH, Ralf Paus, Ulrich Kunzendorf. 2000 *Transplantation* 69:1386
- 11.) The human hair follicle immune system: cellular composition and immune privilege.  
Tatjana Christoph, Sven Müller-Röver, Heike Audring, Des J. Tobin, Barbera Hermes, George Cot-sarelis, **René Rückert**, Ralf Paus. 2000 *Br J Dermatol* 142:862
- 12.) High dose proinflammatory cytokines induce apoptosis of hair bulb keratinocytes *in vivo*.  
**René Rückert**, Gerd Lindner, Silvia Bulfone-Paus, Ralf Paus. *Br J Dermatol*, In Press
- 13.) Suppression of keratinocyte apoptosis by IL-15 and upregulation of IL-15 and IL-15 receptor in psori-atic lesions: Pointer to a role for IL-15 in psoriasis  
**René Rückert**, Khusru Asadullah, Martina Seifert, Vadim M. Budagyan, Ralf Arnold, Claudia Trom-botto, Ralf Paus, and Silvia Bulfone-Paus, *J Immunol*, In Press

## Abstracts:

**1.)** The role of superantigen in atopic inflammation.

Herz U., **Rückert R.**, Seib C., Preiss K., and Renz H.

European Atopic Dermatitis Workshop. February 23-25, 1996, Utrecht, Holland.

**2.)** Superantigen triggers allergic inflammation of the airways.

Herz U., **Rückert R.**, Schnoy N., Köttgen E., and Renz H.

Deutsche Gesellschaft für Immunologie. September 26-28, Hamburg, Germany.

*Immunobiology* 196, 65 C16 (1996).

**3.)** Superantigen als Triggerfaktor der allergischen Atemwegsentzündung.

Herz U., **Rückert R.**, Schnoy N., Köttgen E., and Renz H.

Deutsche Gesellschaft für Allergie und Immunitätsforschung. October 2-5, 1996, Freiburg, Germany.

*Allergo J.* 5, 47 (1996).

**4.)** Superantigen triggers allergic inflammation of the airways.

Herz U., **Rückert R.**, Schnoy N., and Renz H.

*J. Allergy Clin. Immunol.* 99 (1), Part 2, S 363 (1996)

**5.)** Requirement of CD23 expression in development of airway hyperresponsiveness.

**Rückert R.**, Preiss K., Seib C., Yu P., Lamers M.C., Renz H., and Herz U.

XIII. Spring meeting of the Deutsche Gesellschaft für Immunologie. March 6-8, 1997, Binz, Germany.

**6.)** Manipulation of MHC class I expression in murine hair follicles: induced by IFN- $\gamma$ .

Hofmann U., **Rückert R.**, Müller-Röver S., and Paus R.

Society for Investigative Immunology; Washington April 1997. *J. Invest. Dermatol.* 108: 655, 1997

**7.)** A novel IL-2 - IgG2b FP suppresses cutaneous hypersensitivity reaction in mice.

**Rückert R.**, Hofmann U., Paus R., and Bulfone-Paus S.

XXIV. Annual meeting of the Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Forschung. January 24-26, Leipzig, Germany. *Arch. Dermatol. Res.* 289, A 42, (1997).

8.) IL-15-IgG2b fusion protein enhances- IL-2-IgG2b fusion protein suppresses murine Th1 and Th2 immune responses *in vivo*.

**René Rückert**, Thomas Pohl, Ulrich Kunzendorf, Harald Renz, Udo Herz, Hans Krause, and Silvia Bulfone-Paus

28. Annual Meeting of the Deutsche Gesellschaft für Immunologie. Sept. 24.-27. 1997, Würzburg. Germany. *Immunobiology* 197: 2-4, 225, 1997

9.) IL-15 augments Th2 type immune response in vivo

**René Rückert**, Thomas Pohl, Udo Herz, Harald Renz, and Silvia Bulfone-Paus

54. Annual Meeting of the American Academy of Allergy, Asthma and Immunology, March 13-18 1998, Washington DC. *J Allergy Clin Immunol.* 101:1 S56

10.) IL-15 and TNF- $\alpha$  are functional antagonists in the control of apoptosis in murine L929 fibroblasts

Hans Krause, Daniela Ungureanu, Ralf Paus, **René Rückert**, Thomas Pohl, Ulrich Kunzendorf and Silvia Bulfone-Paus.

89. Annual Meeting of the American Academy for Cancer Research March 28-April 1, 1998. *Proc American Ass Cancer Res* 39: 463, 1998

11.) Airway exposure to Bacterial Superantigen (SEB) induces airway inflammation associated with airway hyperresponsiveness - a model for non allergic asthma.

Herz U., **Rückert R.**, Tschernig T., Wollenhaupt K., Neuhaus-Steinmetz U., Pabst R., and Renz H. Experimental Biology 99, Eashington, D.C., April 17-21, 1999

*FASEB Journal* 13: A1126, 1999

## **Vorträge:**

- 1.) Requirement of CD23 expression in development of airway hyperresponsiveness.

**Rückert R.**, Preiss K., Seib C., Yu P., Lamers M.C., Renz H., and Herz U.

XIII. Spring meeting of the Deutsche Gesellschaft für Immunologie. March 6-8, 1997, Binz. Germany.

- 2.) IL-15-IgG2b fusion protein enhances- IL-2-IgG2b fusion protein suppresses murine Th1 and Th2 immune responses *in vivo*.

**René Rückert**, Thomas Pohl, Ulrich Kunzendorf, Harald Renz, Udo Herz, Hans Krause, and Silvia Bulfone-Paus

28. Annual Meeting of the Deutsche Gesellschaft für Immunologie. Sept. 24.-27. 1997, Würzburg. Germany

- 3.) IL-15 augments Th2 type immune response in vivo

**René Rückert**, Thomas Pohl, Udo Herz, Harald Renz, and Silvia Bulfone-Paus

54. Annual Meeting of the American Academy of Allergy, Asthma and Immunology, March 13-18 1998, Washington DC

## Danksagung

Mein Dank gilt an erster Stelle Herrn PD Dr. med. Harald Renz für die Überlassung des Themas der vorliegenden Dissertation, für die engagierte und fordernde Betreuung sowie die vielen Anregungen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. rer. nat. Udo Herz für die exzellente wissenschaftliche und persönliche Unterstützung bei meiner Arbeit. Besonders dankbar bin ich ihm für die Begeisterung und Faszination für das wissenschaftliche Arbeiten, die er mir vermittelt hat.

Mein Dank geht auch an die Arbeitsgruppe um Udo Herz, an Kerstin Gerhold, Thomas Kammertöns, Jan Rosenbaum und Armin Braun für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die Unterstützung bei der praktischen Arbeit sowie an Christine Seib und Katja Preiss für die unendliche Geduld beim Vermitteln der Labortechniken.

Vor allen aber möchte ich meinen Eltern Gabriele und Klaus Rückert danken, die mir durch ihre Unterstützung diese Arbeit erst ermöglicht haben.

## Eidesstattliche Erklärung

René Rückert  
Damerowstr. 60a  
13187 Berlin,

Juli 2000

Ich versichere hiermit an Eides Statt, daß die vorliegende Dissertationsschrift mit dem Titel " Bakteriell  
Superantigen verstärkt die Atemwegsinfektion und bronchiale Atemwegsreagibilität in einem  
Mausmodell der allergischen Sensibilisierung." von mir selbst und ohne die Hilfe Dritter verfaßt wurde.  
Die vorliegende Arbeit stellt auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten dar, alle benutzten Hilfsmittel  
sowie die Literatur sind vollständig angegeben.

A handwritten signature in black ink, reading "René Rückert". The signature is written in a cursive style with a large initial 'R'.

René Rückert